



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM VYUŽITÍ VYBRANÝCH TERMOFILNÍCH
BAKTERIÍ K BIOTECHNOLOGICKÉ PRODUKCI PHA**

STUDY ON PHA PRODUCTION BY SELECTED THERMOPHILIC BACTERIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Zuzana Majanová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1391/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Zuzana Majanová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Studium využití vybraných termofilních bakterií k biotechnologické produkci PHA

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Studium produkce PHA pomocí *Chelatococcus deaguensis* a/nebo *Tepidiphilus thermophilus*

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Zuzana Majanová
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Bakalárska práca sa zaoberala štúdiom termofilných bakteriálnych kmeňov *Tepidiphilus thermophilus* a *Chelatococcus daeguensis* zameraného na produkciu polyhydroxyalkanoátov (PHA). Experimenty boli vypracované na stanovenie vlastností použitia týchto mikroorganizmov v biotechnologickom priemysle. V experimentálnej časti bola obom kmeňom potvrdená prítomnosť génu *phaC*, ktorý indikuje produkciu PHA, a to prostredníctvom polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Následne boli optimalizované podmienky na produkciu PHA. Profilácia podmienok sa zameriavala na stanovenie optimálnej teploty, optimálneho zdroja uhlíka a vplyv prekursoru na nárast biomasy, zloženie a podiel PHA prostredníctvom metódy GC-FID. Posledným experimentom bolo stanovenie využitia vybraných substrátov. Bolo zistené, že optimálne podmienky pre kmeň *Tepidiphilus thermophilus* sú teplota 55 °C a glycerol ako najlepší zdroj uhlíka. Prekursor pôsobil na kmeň inhibične, ale najvyššie množstvo 3HV bolo stanovené pri vzorkách s pridaním kyseliny valerovej. Kmeň *Chelatococcus daeguensis* mal stanovenú optimálnu teplotu na 45 °C a optimálnym zdrojom uhlíka bola glukóza. Najlepšie bunkami metabolizovaný prekursor bol 1,4-butandiol. Oba bakteriálne kmene sú schopné využitia mnohých substrátov, kde medzi najlepšie patrí glukóza a kyselina valerová.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study of thermophilic bacterial strains *Tepidiphilus thermophilus* and *Chelatococcus daeguensis* aimed at the production of polyhydroxyalkanoates (PHA). Experiments were developed to determine properties of use of these microorganisms in the biotechnological industry. In the experimental parts, the presence of the *phaC* gene indicating PHA production was confirmed by both bacteriological strains by polymerase chain reaction (PCR). Subsequently, the conditions for PHA production were optimized. Condition profiling aimed at determining the optimal temperature, optimal carbon source, and the effect of the precursor on cell growth, composition and amount of PHA through GC-FID. The last experiment was to determine the utilization of selected substrates. The optimal conditions for the *Tepidiphilus thermophilus* strain were temperature above 55 °C and glycerol as the best carbon source. Precursors inhibited cell growth, but the highest amount of 3HV was determined when valeric acid was added to medium. The *Chelatococcus daeguensis* strain had an optimal temperature of 45 °C and glucose was optimal carbon source. The best cell metabolizing precursor was 1,4-butanediol. Both bacterial strains were capable of utilizing many substrates where glucose and valeric acid were best.

KEÚČOVÉ SLOVÁ

Termofilné baktérie, polyhydroxyalkanoáty (PHA), produkcia, NGIB, *Tepidiphilus thermophilus*, *Chelatococcus daeguensis*

KEYWORDS

Thermophilic bacteria, polyhydroxyalkanoates (PHA), production, NGIB, *Tepidiphilus thermophilus*, *Chelatococcus daeguensis*

MAJANOVÁ, Z. *Studium využití vybraných termofilních bakterií k biotechnologické produkci PHA*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 55 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

Pod'akovanie:

Na tomto mieste by som rada poďakovala svojmu vedúcemu bakalárskej práce pánovi doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, pomoc a cenný čas, ktorý mi venoval. Ďalej by som sa chcela poďakovať Ing. Ivane Nováčkovej za jej trpezlivosť, pomoc pri práci v laboratóriu a za jej rady pri spracovaní práce. Taktiež by som rada poďakovala svojej rodine a najbližším, ktorí ma podporovali počas štúdia.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická časť	9
2.1	Extrémofilné baktérie.....	9
2.1.1	Typy prostredí.....	9
2.1.2	Rozdelenie extrémofilných baktérií na základe prostredia	9
2.1.3	Extrémotolerantné mikroorganizmy	10
2.2	Termofilné baktérie.....	10
2.2.1	Charakteristika	11
2.2.2	Evolúcia termofilných baktérií	11
2.2.3	Náleziská termofilných baktérií	12
2.2.4	Mechanizmus adaptácie termofilných baktérií na prostredie	13
2.2.5	Príklady termofilov	14
2.3	<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	14
2.4	<i>Chelatococcus deaguensis</i>	15
2.5	Polyhydroxyalkanoáty	15
2.5.1	Delenie PHA.....	16
2.5.2	Vlastnosti PHA	16
2.5.3	Produkcia baktériami.....	17
2.5.4	Biosyntéza PHA.....	17
2.5.5	PHA syntáza	18
2.6	Polymerázová reťazová reakcia.....	19
2.6.1	Multiplex polymerázová reťazová reakcia	20
2.7	Biotechnológie využívajúce extrémofilné baktérie	20
2.7.1	NGIB mikroorganizmy.....	21
2.8	Súčasný stav riešenej problematike	22
3	Experimentálna časť	24
3.1	Použité baktérie, chemikálie a prístroje	24
3.1.1	Použité baktérie.....	24
3.1.2	Použité chemikálie na kultiváciu mikroorganizmov.....	24
3.1.3	Použité komponenty pre izoláciu DNA, PCR a agarózovú gélovú elektroforézu	24
3.1.4	Ostatné chemikálie	24

3.1.5	Použité prístroje	25
3.2	Kultivácia baktérií <i>Chelatococcus daeguensis</i> a <i>Tepidiphilus thermophilus</i>	25
3.2.1	Príprava inokula a priebeh kultivácie	25
3.2.2	Príprava živných médií	26
3.3	Príprava roztokov	27
3.3.1	Príprava lyzačného pufru	27
3.3.2	Príprava TBE pufru na gélovú elektroforézu	27
3.3.3	Príprava fosfátového pufru (PBS)	27
3.3.4	Príprava 2 % agarózového gélu pre elektroforézu	28
3.4	Použité metódy	28
3.4.1	Izolácia bakteriálnej DNA pomocou tepelnej lýzy	28
3.4.2	Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácia DNA	28
3.4.3	Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	28
3.4.4	Stanovenie množstva biomasy	30
3.4.5	Stanovenie zloženia a množstva PHA v biomase	31
3.4.6	Stanovenie využitia vybraných substrátov na ELISA reader	32
4	Výsledky a diskusia	33
4.1	Stanovenie schopnosti bakteriálneho kmeňa produkovať PHA pomocou molekulárnej biologickej metódy	33
4.2	<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	34
4.2.1	Stanovenie optimálnej teploty na nárast biomasy a podiel PHA	35
4.2.2	Stanovenie optimálneho zdroja uhlíku na nárast biomasy a podiel PHA	36
4.2.3	Stanovenie vplyvu prekursorov na nárast biomasy, zloženia a podiel PHA.	38
4.2.4	Optimálna teplota, zdroj uhlíku a stanovenie vplyvu prekursoru na nárast biomasy, zloženie a podiel PHA	39
4.3	<i>Chelatococcus daeguensis</i>	40
4.3.1	Stanovenie optimálnej teploty na nárast biomasy a podiel PHA	40
4.3.2	Stanovenie optimálneho zdroja uhlíku na nárast biomasy a podiel PHA	41
4.3.3	Stanovenie vplyvu prekursorov na nárast biomasy, zloženia a podiel PHA.	43
4.3.4	Optimálna teplota, zdroj uhlíku a stanovenie vplyvu prekursoru na nárast biomasy, zloženie a podiel PHA	44
4.4	Stanovenie využitia vybraných substrátov	44
5	Záver	48

6	Zoznam použitej literatúry	50
7	Zoznam použitých skratiek a symbolov.....	55
	7.1 Použité skratky	55

1 ÚVOD

V dnešnej dobe je veľkým problémom a hlavnou globálnou témou diskusií produkcia a použitie plastov. Vzhľadom na ich mnohé výborné vlastnosti sú častokrát používané ako najčastejší obalový materiál, izolačný materiál a v mnohých ďalších prípadoch, kde sa využíva ich ľahká váha, schopnosť nepodliehať korózii, či nižšia teplota tavenia. Naopak ich najväčšou nevýhodou je najčastejšie rezistencia, ktorá spôsobuje veľké ekologické problémy. Vyriešením týchto problémov nám prináša vývoj technológií na výrobu bioplastov, ktoré svojimi vlastnosťami sú schopné konkurovať, dokonca až prevyšovať vlastnosti dnes používaných plastov. Jedným z týchto bioplastov sú polyhydroxyalkanoáty (PHA), ktoré sú produkované niektorými druhmi mikroorganizmov ako napríklad odpoveď na stres vo forme zásob uhlíka a energie.

Biotechnologický priemysel každým rokom zvyšuje nároky na výber najvhodnejšieho bakteriálneho kmeňa, ktorý by mal disponovať vlastnosťami poháňajúcimi ďalšiu generáciu biotechnologických procesov vpred. Vývoj k lepšiemu je vo všetkých priemyselných odvetviach prirodzený rovnako ako aj v biotechnológiách. Faktory, od ktorých sa odráža výber mikroorganizmov sú predovšetkým stále kvalitnejšie produkty a nízke finančné nároky na proces výroby. Trendom v biotechnologickom priemysle sú extrémofilné mikroorganizmy, ktoré sú v mnohých smeroch študované na ich využitie v NGIB a tým spiate znižovanie nákladov na proces výroby.

V súčasnosti jasnými favoritmi medzi extrémofilnými mikroorganizmami sú termofilné baktérie. Ich prevedenie do biotechnologickej praxe by prinieslo množstvo výhod, ktoré sú spojené s ich vlastnosťami a spôsobom rastu v extrémnych podmienkach. Medzi vyzdvihované vlastnosti nepochybne patrí fakt, že ich optimálne teploty na rast sa pohybujú za hranicami normálnych podmienok, čo prináša menšiu šancu na kontamináciu inými mikroorganizmami a teda z toho vyplývajúce nižšie náklady na steriláciu počas biotechnologických procesov. Ďalšou výhodou je možnosť „recyklácie“ energie vo forme tepla počas biotechnologických procesov, a to vzhľadom k tomu, že tvorba energie v priemysle je považovaná za najviac nákladnú, finančne, ale aj technologicky. Hlavnou výhodou je ušetrenie na chladení, ktoré predstavuje veľkú finančnú náročnosť v technológiách.

Zámerom tejto práce je výskum dvoch kmeňov termofilných baktérií *Tepidiphilus thermophilus* a *Chelatococcus daeguensis*. Experimenty boli zamerané na optimalizáciu podmienok, pri ktorých zmieňované termofilné baktérie sú schopné produkcie polyhydroxyalkanoátov, resp. potvrdiť ich potenciál na použitie v biotechnologickom priemysle.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Extrémofilné baktérie

Extrémofilné baktérie patria do skupiny mikroorganizmov, ktoré sú schopné života a reprodukcie v extrémnych podmienkach, teda v podmienkach, ktoré sa líšia od optimálnych podmienok života pre ostatné mikroorganizmy. Za normálne podmienky môžeme považovať teplotu v rozmedzí 20–25 °C (pri mikroorganizmoch je za normálnu teplotu považovaná teplota až do 37 °C), neutrálne pH (6–8), atmosférický tlak a 20 % obsah kyslíku v atmosfére. Všetky hodnoty teploty, pH, tlaku a iné, mimo hodnoty normálnych podmienok môžeme považovať za extrémne podmienky. Život extrémofilných mikroorganizmov je úzko spojený so špecifickými fyziologickými vlastnosťami, predovšetkým prítomnosťou špeciálnych enzýmov a metabolických dráh. Oblasť prítomnosti extrémofilných mikroorganizmov na Zemi je veľmi široká. Môžu sa nachádzať v sopečných prameňoch pri extrémne vysokých teplotách alebo naopak pri extrémne nízkych teplotách v polárnych oblastiach na Zemi. Taktiež sa nachádzajú v oblastiach vysokého a nízkeho pH alebo pri vysokej koncentrácii soli [1, 2].

2.1.1 Typy prostredí

Extrémofilné mikroorganizmy zastávajú všetky možnosti života v extrémnych podmienkach. Extrémne prostredia rozdeľujeme na fyzikálne extrémny, kde teplota, žiarenie alebo tlak dosahujú krajné hodnoty. Ďalej rozlišujeme geochemické extrémny, pri ktorých sa zameriavame na hodnoty salinity, pH, množstva obsahu prítomného kyslíka alebo redoxného potenciálu. Nájdeme ich v prostredí pri teplotách dosahujúce extrémne hodnoty od –15 °C, kde extrémofilné organizmy prežívajú v ľade, ale aj baktérie, ktoré vykazujú rastovú teplotu v horúcich prameňoch, kde teplota dosahuje až 95 °C. Extrémnym prostredím pre rast mikroorganizmov sú aj hodnoty pH pohybujúce sa v rozmedzí od 0±3 do 10±12. Extrémofilné mikroorganizmy dokážu rásť aj v hyperslanom prostredí s vysokou koncentráciou soli od 5 až 10 %, v prípadoch hyperhalofilných mikroorganizmov môže táto hodnota byť až viac ako 20% [3, 4].

2.1.2 Rozdelenie extrémofilných baktérií na základe prostredia

Extrémofilné mikroorganizmy rozdeľujeme do niekoľkých skupín na základe typu prostredia, v ktorom rastú. Acidofilné baktérie sa vyskytujú v prostredí s nízkym pH, naopak, ak sa v podmienkach s vysokým pH nachádzajú baktérie, označujeme ich ako alkalofilné baktérie. Piezofilné baktérie existujú v prostredí s vysokým tlakom. Mikroaerofilné baktérie môžeme nájsť v podmienkach s nízkym obsahom kyslíku. Psychofilné baktérie sa vyznačujú tým, že pre ich rast je vyhovujúca nízka teplota. V neposlednom rade je skupina termofilných baktérií, ktoré rastú pri vyšších teplotách [2,4].

Extrémofilné baktérie sa najlepšie charakterizujú napríklad v rámci konkrétnej kultúry na základe ich rastových profilov v medzných údajoch. Takýmto údajom je napríklad profilová teplota – minimálna, optimálna a maximálna s označením T_{\min} , T_{opt} , T_{\max} . Pri charakterizovaní podmienok extrémofilných mikroorganizmov sa môžeme stretnúť s tzv. multiextrémofilnými mikroorganizmami. Tieto mikroorganizmy sú definované dvoma alebo viacerými hodnotami extrémnych podmienok [2, 4].

2.1.3 Extrémotolerantné mikroorganizmy

Existujú mikroorganizmy, ktoré sú síce schopné života v extrémnych podmienkach, ale optimálny rast dosahujú v prostredí s hodnotami rovnakými, ako normálne podmienky pre život. Pre tento typ mikroorganizmov bol zadefinovaný pojem extrémotolerantné mikroorganizmy. Rovnako ako extrémofilné mikroorganizmy aj extrémotoleranti sú charakterizované maximálnymi a minimálnymi hodnotami extrémnych podmienok. Opäť ich rozdeľujeme na základe prostredia, v ktorom sa nachádzajú. Termofilné, alkalofilné, halofilné majú svoj typ extrémotolerantného mikroorganizmu (termotolerantné, alkalotolerantné, halotolerantné), ktorého škála hodnôt optimálneho prostredia končí tam, kde začínajú optimálne hodnoty extrémofila. Medzi extrémotolerantné mikroorganizmy patria napríklad aj radiorezistentné baktérie, ktoré žijú v prostredí, kde je vysoký stupeň radiácie. Rozdelenie extrémofilných a extrémotolerantných mikroorganizmov na základe typu prostredia je zhrnuté v tabuľke 1 [1].

Tabuľka 1 Rozdelenie extrémofilných a extrémotolerantných mikroorganizmov na základe definovania hodnôt prostredia [1]

Mikroorganizmus	Minimum	Optimum	Maximum
Termotolerantný	$T_{\min} -$	$T_{\text{opt}} < 50\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{\max} < 60\text{ }^{\circ}\text{C}$
Termofilný	$T_{\min} -$	$T_{\text{opt}} \geq 50\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{\max} \geq 60\text{ }^{\circ}\text{C}$
Extrémne termofilný	$T_{\min} \geq 35\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{opt}} \geq 65\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{\max} < 75\text{ }^{\circ}\text{C}$
Hypertermofilný	$T_{\min} \geq 60\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{opt}} \geq 80\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{\max} \geq 85\text{ }^{\circ}\text{C}$
Alkalotolerantný	$\text{pH}_{\min} \geq 6,0$	$\text{pH}_{\text{opt}} < 8,5$	$\text{pH}_{\max} > 9,0$
Alkalofilný	$\text{pH}_{\min} \geq 7,5$	$\text{pH}_{\text{opt}} \geq 8,5$	$\text{pH}_{\max} \geq 10,0$
Nehalofilný	$\text{NaCl}_{\min} -$	$\text{NaCl}_{\text{opt}} \leq 0,5\text{ M}$	$\text{NaCl}_{\max} \leq 1\text{ M}$
Halotolerantný	$\text{NaCl}_{\min} -$	$\text{NaCl}_{\text{opt}} 0,25 - 1,5\text{ M}$	$\text{NaCl}_{\max} \leq 2,5\text{ M}$
Halofilný	$\text{NaCl}_{\min} 1\text{ M}$	$\text{NaCl}_{\text{opt}} \geq 1,5\text{ M}$	$\text{NaCl}_{\max} -$
Extrémne halofilný	$\text{NaCl}_{\min} \geq 1,5\text{ M}$	$\text{NaCl}_{\text{opt}} \geq 2,5\text{ M}$	$\text{NaCl}_{\max} -$

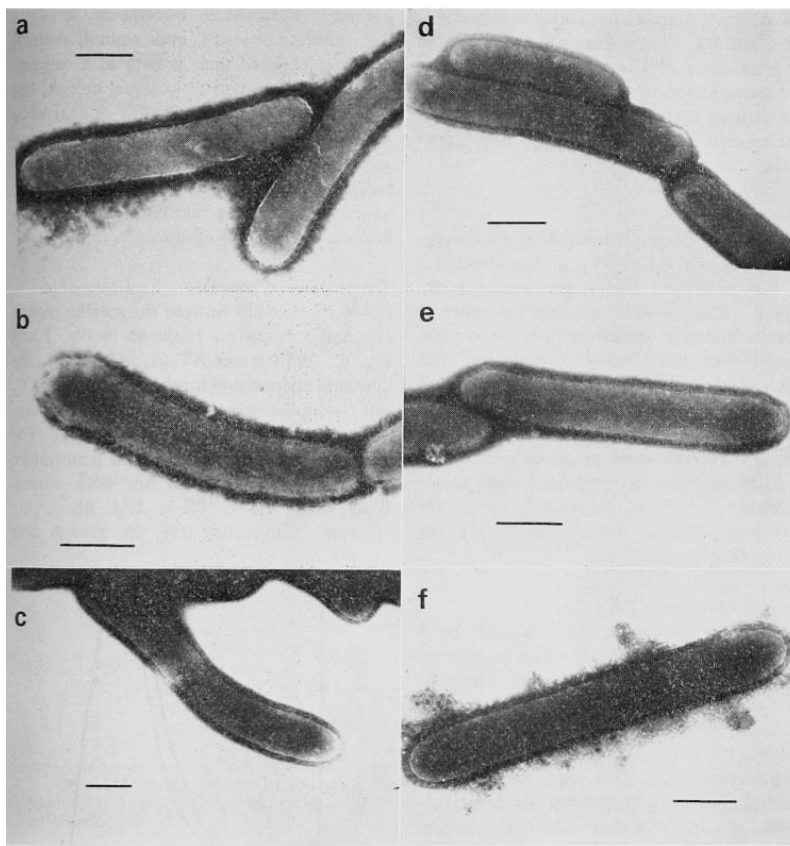
2.2 Termofilné baktérie

Prostredia s vysokou teplotou, akými sú napríklad geotermálne pramene alebo sopečné miesta, sú výbornými miestami pre optimálny rast termofilných baktérií. Za maximálnu teplotu, v ktorej ešte môžeme nájsť život sa považuje $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, pretože za touto hodnotou sú aminokyseliny a nukleotidy zničené. Dôvodom rastu baktérií v takto vysokých teplotách je ich polyfyletický pôvod. Mikroorganizmy, ktoré sú vystavované vysokým teplotám majú termostabilnejšie makromolekuly, než makromolekuly bežných mikroorganizmov. Vďaka molekulárnemu vývoju a rastu pri vysokých teplotách majú termofilné baktérie jedinečné metabolické a enzymatické vlastnosti a preto sú tak často využívané v biotechnologickom priemysle [5].

2.2.1 Charakteristika

Termofilnými baktériami, ktorých teplota rastu bola pri 70 °C, sa po prvýkrát začal v roku 1888 zaoberať Miquel. Odvtedy prebehlo mnoho vedeckých výskumov termofilných baktérií, hlavne z rodu *Bacillus* a *Clostridium*, kvôli ich biotechnologickému potenciálu. Izolácia termofilných baktérií z geotermálnych oblastí v rôznych kútoch sveta (Turecko, Taliansko, Grécko, Čína atď.) viedla k ich fenotypovej a genotypovej charakterizácii. Termofilné baktérie majú rastovú optimálnu teplotu okolo 55 °C. Rastová optimálna teplota dosahujúca hodnotu 65 °C je typická pre extrémne termofilné baktérie a teplota 80 °C je charakterizujúca pre hypertermofilné druhy [6, 7].

Ak by sme chceli popísať základnú charakteristiku termofilných baktérií, je nutné ich rozdeliť na dve skupiny, a to gram-pozitívne a gram-negatívne baktérie, ktoré majú mierne odlišné charakteristiky štruktúry bunkovej steny. Bunková stena gram-negatívnych baktérií má tenkú peptidoglykánovú vrstvu medzi plazmovou membránou a fosfolipid-lipopolysacharidovou vonkajšou membránou. Bunková stena u gram-pozitívnych baktérií obsahuje murein (hrubá peptidoglykánová vrstva zosieťovaná krátkymi peptidovými fragmentami) [8].



Obrázok 1 Mikroskopická fotka termofilných baktérií negatívne zafarbených vzoriek 1% fosfotungstátom [9]

2.2.2 Evolúcia termofilných baktérií

Od objavenia termofilných baktérií si vedci kladli otázky o pôvode týchto druhov mikroorganizmov. Existujú dve hypotézy. Prvá teória o pôvode termofilných baktérií sa opiera o to, že prvé organizmy vznikli v prostredí s vysokou teplotou a následne sa od termofilných organizmov odvodili ďalšie organizmy. Druhá teória predpokladá, že prvými organizmami

neboli termofilné druhy, ale na základe zmeny teplotných podmienok majú termofilné organizmy sekundárny pôvod v psychofilných alebo mezofilných druhoch. Nasvedčuje tomu aj fakt, že keď sa vyvinuli prokaryotické druhy, bola teplota prostredia stredná až nízka, čo naznačuje, že mezofilné druhy sa vyvinuli skôr. Spoločný pôvod by mohla vysvetliť aj podobnosť v rámci fyziologických skupín (heterotrofné, chemolitotrofné, fototrofné druhy) medzi mezofilnými a termofilnými organizmami. Ak by sme sa na tieto teórie pozreli v rámci fyziologických procesov, zaujímal by nás práve fakt, že všetky makromolekuly termofilných druhov sú pri vyšších teplotách stabilné, pričom funkčne rovnaké makromolekuly mezofilov by za tých istých teplotných podmienok boli zničené. Z tohto dôvodu by muselo nastať veľa genetických zmien, aby termofilné druhy boli vyvinuté z mezofilných druhov. Na druhú stranu by mohol byť vyvinutý prvý mikroorganizmus, ktorý je schopný rásť aj pri vyšších teplotách a následne z neho vznikol druh, ktorý je citlivý na vysoké teploty. Túto teóriu ale neguje fakt, že termofília nie je obmedzená na jedinú fylogenetickú líniu baktérií, ale je nájdená v archaeobaktériách a eubaktériách. Medzi archaeobaktériami dnes máme mezofilné aj extrémne termofilné baktérie so širokým teplotným rozpätím pre rast. Táto rozmanitosť nás môže priviesť k tomu, že termofília mohla vzniknúť súčasne vo viacerých druhoch organizmov. Napríklad napriek miernemu až studenému podnebiu, v tej istej oblasti sa nachádzala aj sopečná činnosť, ktorá mohla byť miestom zrodu termofilných baktérií. To znamená, že mezofilné a termofilné druhy mohli vzniknúť súčasne [5, 10].

2.2.3 Náleziská termofilných baktérií

Biotopy s vysokými teplotami sú menej rozšírené ako tie s miernymi teplotami, no napriek tomu nám prinášajú rôznorodé miesta, ktoré sú vhodné pre termofilné baktérie. Hoci teplota prostredia má výrazný vplyv na rast baktérií, nie je to jediný parameter optimálnych podmienok. Medzi ďalšie rozhodujúce vplyvy patrí napríklad pH, iónová sila alebo dostupnosť živín ako zdroj energie. Bakteriálna druhová rozmanitosť v termálne kyslom prostredí je menej rozšírená ako naopak v neutrálnom prostredí. Po mnohých výskumoch sa termofilné baktérie javia v prírode ako kozmopolitné organizmy. Termofilné mikroorganizmy boli izolované z rôznorodých miest vrátane horúcich alebo sírnych prameňov, púštnych pieskoch, v horúcich priepastiach hlboko na dne mora a taktiež v rôznych potravinách. Termofilné mikroorganizmy sú prítomné nie len v prírodných biotopoch, ale taktiež napríklad v teplovodných potrubiach alebo v horúcich odpadových vodách. Druhy, ktoré sú schopné tvoriť spóry sú prítomné v aeróbnych aj anaeróbnych prostrediach, napríklad anaeróbne a mikroaerofilné bahná. Acidotermofilné baktérie, *Sulfolobus* alebo *Thiobacillus*, boli nájdené výlučne v kyslých horúcich prameňoch a na skládkach odpadov. Poznatky o charaktere náleziska termofilných baktérií by mohli byť prínosné pre štúdie mikroorganizmov na biotechnologické účely. Tieto informácie nám ponúkajú možnosť zhodnotiť potenciál mikroorganizmu a jeho využitie v technologických procesoch, resp. hľadať nové baktérie s požadovanými schopnosťami [10, 11].



Obrázok 2 Nálezisko *Thermus aquaticus* v Yellowstonskom národnom parku v USA [3]

2.2.4 Mechanizmus adaptácie termofilných baktérií na prostredie

Termofilné baktérie sú vysoko špecializované a bezpochybne využívajú dômyselné mechanizmy na adaptáciu v prostredí, ktoré je definujúce vyššou teplotou. Analýza dôležitých makromolekúl v termofilných baktériách odhalila malé zmeny v štruktúre proteínov, nukleových kyselín a lipidov v porovnaní so štruktúrou mezofilných baktérií. Navyše u extrémne termofilných baktériách pozorujeme unikátne polyamíny, konkrétne termíny a termospermíny, ktoré sa podieľajú na stabilizácii syntézy proteínov a na ochrane makromolekúl pred vysokou teplotou. Permeabilita cytoplazmatickej membrány by mala byť kontrolovaná pri tomto type baktérií. Vzhľadom ku zvýšenému intramolekulárnemu pohybu lipidov, ktorý je zapríčinený zvýšenou teplotou, je za následok aj zvýšená permeabilita protónov. V dôsledku tohto pohybu sa molekuly vody zachytávajú v lipidovej vrstve, čo prispieva k pohybu protónov z jednej molekuly do druhej. Iné ióny sa môžu difúzovať cez membránu bakteriálnej bunky. Tento proces je taktiež závislý na teplote. Rovnako termofilné baktérie disponujú mechanizmami na zachovanie štruktúry proteínov, ktoré by v dôsledku zvýšenej teploty mohli zmeniť svoju štruktúru. Ďalšie štúdie ukázali, že baktérie prispôbujú priepustnosť cytoplazmatickej membrány k rastovej teplote termofilného mikroorganizmu. Extrémne stavy si vo všeobecnosti nárokuje buď na adaptáciu v prostredí sekvenciou aminokyselín proteínov mutáciami, optimalizáciou slabých interakcií medzi proteínom a rozpúšťadlom alebo vplyvom vonkajších faktorov, akými sú napríklad kofaktory [2, 10, 11].

Nukleové kyseliny termofilných baktérií majú inherentnú štruktúru, ktorá zabezpečuje stabilitu voči vysokým teplotám. Jedným z príkladov je deoxyribonukleová kyselina, ktorej zastúpenie báz je odlišné u mezofilných a termofilných baktérií. Pri termofilných baktériách je celá DNA stabilizovaná voči vysokým teplotám prostredníctvom soľných mostíkov. Tepelnú stabilitu nukleových kyselín vysvetľuje prítomnosť väčšieho počtu báz guanínu a cytozínu

v špecifickej oblasti párovania báz. Väčší počet týchto báz poskytuje viac vodíkových mostíkov a tým zvýšenú stabilitu. Taktiež oblasť párovania báz v tRNA obsahuje viac tiolovaného tymidínu, čo spôsobuje silnejšie väzby vo vnútri molekuly. Stupeň tiolácie sa zvyšuje so zvyšovaním teploty [11].

Na zvýšenie tepelnej stability stačia len malé zmeny v štruktúre proteínu, čo má za následok väčší počet intramolekulárnych interakcií. Zmena už jednej aminokyseliny v štruktúre môže viesť k stabilite proteínu. Zmeny nemusia viesť len k rozdielnemu zloženiu aminokyselín, stačí ak dôjde k inej sekvencii aminokyselín. Aj pri proteínoch platí, že zvýšený počet iónových a vodíkových väzieb a intramolekulárnych interakcií vedie k zvýšenej termostabilite [11].

V slnečných alebo horúcich náleziskách sú pozorované veľké výkyvy teplôt, ktoré sú z veľkej časti spôsobené fyzikálnou, chemickou a mikrobiálnou aktivitou a vyžadujú rôznorodosť v populáciách mikroorganizmov. Táto široká škála mikroorganizmov znamená, že každá populácia sa metabolizuje pri odlišných teplotách. To viedlo mikroorganizmy k „zavedeniu“ rezistentného štádia, ktoré umožňuje optimálne prežitie v čase fyzického alebo chemického stresu. Do istej miery to môže vysvetliť prevahu množstva prítomných baktérií schopných tvorby spór v týchto náleziskách. Treba zobrať do úvahy, že v horúcich prameňoch s konštantným príjmom živín nie je tento nátlak na tvorbu spór až taký veľký, napriek tomu, že sa tu vyvinuli baktérie rozdielne prispôbosené podmienkam. V tomto prípade je zaujímavé porovnať sporogénne a asporogénne termofilné baktérie, ktorú sú metabolicky podobné. V spóre je uložená veľká časť genetickej informácie. Je možné, že asporogénne mikroorganizmy selektívne získavajú odlišné výhodné fyzikálne a chemické vlastnosti [2, 10, 11].

2.2.5 Príklady termofilov

Ak by sme rozdelili termofilné baktérie podľa spôsobu výživy, zahŕňali by fototropné druhy (*Chloroflexus aurantiacus*), chemoautotrofné druhy (*Methanobacterium thermoautotrophicum*), chemoheterotrofné druhy (*Thermoanaerobium brockii*), chemosyntetické mixotrofné druhy, ktoré môžu rásť autotrofné alebo heterotrofné (*Sulpholobus acidocaldarius*). Medzi termofilné baktérie zaradíme gram-pozitívne a gram-negatívne, anaeróbne, aeróbne, acidofilné a neutrofilné. Podľa tvaru baktérií sú známe špirálovité, valcovité alebo guľovité termofilné baktérie [11].

2.3 *Tepidiphilus thermophilus*

Tepidiphilus thermophilus môže rásť pri teplotách 30–60 °C, pričom optimálny rast je v rozmedzí hodnôt 50–55 °C v prostredí s pH hodnotou 6,5–7. Rod *Tepidiphilus* bol, spolu s rodom *Petrobacter*, vyizolovaný z rôznych častí Zemi, vedeckým tímom Abhijit Poddar vo vedeckom centre Insitut of Life Sciences v Indii. Baktérie kmeňa *Tepidiphilus* sú gram-negatívne, široké 0,6–0,65 µm a 1,5–1,8 µm dlhé, nesporulujúce s tyčinkovitým tvarom a pohyblivé pomocou bičika. Rastú aeróbne, pričom anaeróbny rast bol potvrdený v prítomnosti dusičnanov. Rod *Tepidiphilus* je chemoorganotrofný a organické kyseliny sa môžu považovať za hlavný zdroj uhlíka. Kolónie na tuhom živnom médiu sú guľaté, hladké, krémovej farby. Tento kmeň pozitívny na oxidázu a katalázu. Rast je pozitívny na maláte, kapronáte, sukcináte, fumaráte, pyruváte, kyseline glutámovej a kyseliny asparágovej.

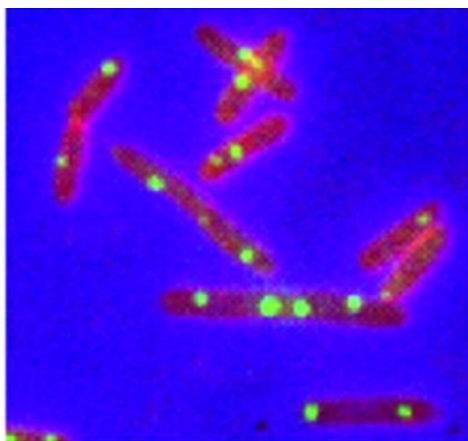
Bunková stena peptidoglykánu obsahuje kyselinu mezodiaminopimelovú. Typový kmeň JHK30^T bol vyizolovaný z horúceho prameňa v Indii [12, 13].

2.4 *Chelatococcus daeguensis*

Rod *Chelatococcus* spadá do skupiny alfabroteobaktérií. Kmeň *Chelatococcus daeguensis* bol úspešne vyizolovaný pri vysokých teplotách a v aeróbnom prostredí z rôznych biotopov, ako napríklad uhoľné elektrárne, odpadové vody. *Chelatococcus daeguensis* je termotolerantná baktéria, ktorej bunky sú gram-negatívne a nesporujúce. Bunky majú tvar tyčiniek a sú široké 0,3–0,6 µm, pričom ich dĺžka dosahuje až 4,0 µm. Kolónie sú kruhové, konvexné a stredne žltej farby. Povrch majú hladký, lesklý. Kolónie majú v priemere 0,7–1,0 mm po trojdňovej inkubácii pri teplote 37 °C. Optimálna teplota pre rast je v rozmedzí od 30–37 °C. Optimálna hodnota pH, pri ktorom baktéria rastie je 7–7,5. Podobne ako *Tepidiphilus thermophilus*, anaeróbny rast je možný v prítomnosti dusičnanov [14, 15].

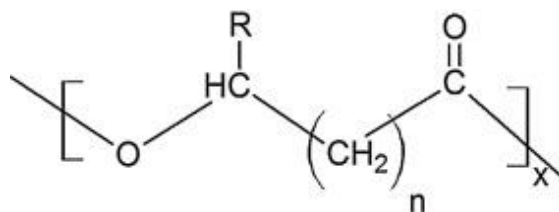
2.5 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú alifatické polokryštalické polyestery hydroxyalkanoátov. PHA sa nachádzajú v bunkách mikroorganizmov ako intracelulárne materiály a plnia funkciu zásobných látok. Baktérie, v čase keď sa nachádzajú v extrémnych podmienkach uchovávajú PHA v granulovaných formách o veľkosti od 0,2 do 0,5 µm v bunkovej štruktúre, konkrétne v cytoplazme [17, 18].



Obrázok 3 Kultúra *Cupriavidus necator*, ktorá po 10 minútach inkubácií pri 30 °C po prenesení na Nutrient Broth médium začala tvorbu PHB granúl. Bunky boli zafarbené fluorescenčným farbivom FM4-64 [28]

Prvé zmienky o PHA pochádzajú už z roku 1925, kedy francúzsky vedec Lemoigne poprvýkrát objavil PHA v baktérii *Bacillus megaterium* vo forme poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB). V roku 1958 vedci Macrae a Wilkinson objavili funkciu PHA v baktériách. Do dnešnej doby bolo objavených viac ako 90 gram-pozitívnych a gram-negatívnych druhov baktérií, ktoré produkujú PHA [17, 19].



Obrázok 4 Štruktúra polyhydroxyalkanoátu [19]

2.5.1 Delenie PHA

Polyhydroxyalkanoáty sú prírodné polyestery 3-, 4-, 5-, a 6-hydroxyalkanoových kyselín. Štúdium PHA sa zameriava na ich molekulovú hmotnosť a štruktúru. Polyhydroxyalkanoáty sa delia do troch hlavných tried podľa dĺžky reťazca monoméru na krátke (SCL) stredné (MCL) a dlhé (LCL) [17].

Tabuľka 2 Rozdelenie PHA podľa počtu uhlíkov v jednotke monoméru a zástupcovia triedy [17]

Trieda PHA	Short-chain-length SCL	Medium-chain-length MCL	Long-chain-length LCL
Počet uhlíkov	5 a menej	6 až 14	Viac ako 14
Zástupcovia	3-hydroxybutyrát	3-hydroxyhexanoát	Málo študované
	3-hydroxyvalerát	3-hydroxyoktanoát	

Delenie PHA na základe biotechnologickej výroby pozostáva jednak z homopolyesterov, ktoré sú tvorené len z jedného typu monoméru, a jednak heteropolyesterov, ktoré sú následne zoskupené do kopolyesterov (monoméry rôznych základných alebo bočných reťazcov) a terpolyestery (tvorené z monomérov, ktoré sú rozdielne v bočných reťazcoch) [20].

2.5.2 Vlastnosti PHA

Momentálne je identifikovaných viac ako 150 typov monomérov PHA. Rozdelenie a typ týchto monomérov určuje výsledné vlastnosti polyméru. Určujú, či sa bude jednať o polymér s vlastnosťami tvrdého plastu alebo o elastickú gumu [21].

V súčasnosti sú skúmané najmä dva typy polyhydroxyalkanoátov. Prvý je poly(3-hydroxybutyrát) známy pod skratkou PHB. Jeho vlastnosťami sú tuhosť a krehkosť. Má vysoký stupeň kryštalinity (mieru usporiadanosti makromolekúl) a teplota topenia (180 °C) je blízka teplote rozkladu (200 °C). Tieto vlastnosti sa stávajú v istej miere prekážkou pri spracovateľnosti tohto polyméru a jeho miesta na trhu. Ďalším typom polyhydroxyalkanoátu, ktorý je v dnešnej dobe často skúmaný kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát), často označovaný ako PHBV. Vzniká zavedením jednotiek 3-hydroxyvalerátov (3HV) do pôvodnej štruktúry PHB. Táto modifikácia narúša vysokú kryštalickú štruktúru PHB (znižuje sa stupeň kryštalinity), čím sa zdokonaľujú vlastnosti polyméru. Konkrétne sa zlepšujú mechanické vlastnosti, miera degradácie, čo je spojené s lepšou spracovateľnosťou a ľahším uvedením na trh. Oproti polyméru PHB má nižší bod topenia (130 °C) [21, 22].

Tabuľka 3 Porovnanie mechanických vlastností PHB, PHBV (80 % 3HB a 20 % 3HV) a polypropylénu PP [22]

Mechanické vlastnosti	PHB	PHBV	PP
Bod topenia [°C]	179	145	170
Pevnosť v ťahu [MPa]	40	32	34,5
Youngov model pružnosti [GPa]	3,5	1,2	1,7
Ťažnosť [%]	6	50	100–600
Hustota [kg/dm ³]	1,2	1,15	0,9

2.5.3 Produkcia baktériami

Ako bolo už vyššie uvedené, isté druhy baktérií sú schopné syntetizovať PHA vo forme zásob uhlíka a energie. Táto syntéza je vyvolaná ako odpoveď na stres, kedy sa baktéria nachádza v extrémnych podmienkach alebo pri dostupnosti nadbytku zdroja uhlíku, pričom chýbajú niektoré esenciálne živiny (kyslík, dusík, fosfor alebo horčík) [23].

Baktérie, ktoré produkujú PHA sa delia na 2 skupiny podľa kultivačných podmienok. Prvá skupina zahŕňa baktérie, ktoré si nárokuje obmedzenie základných živín (kyslík, dusík, fosfor, horčík) na syntézu PHA z nadbytku uhlíka. Baktérie, ktoré patria do tejto skupiny sú *Cupriavidus necator*, *Protomonas extorquens*, *Protomonas oleovorans*. Druhá skupina baktérií nevyžaduje obmedzenie živín na produkciu PHA, pričom počas rastu môžu kumulovať polymér. Do tejto skupiny zaradíme baktérie *Alcaligenes latus*, mutantný kmeň *Azotobacter vinelandii* a rekombinantné kmene *E. coli* [23, 24].

2.5.4 Biosyntéza PHA

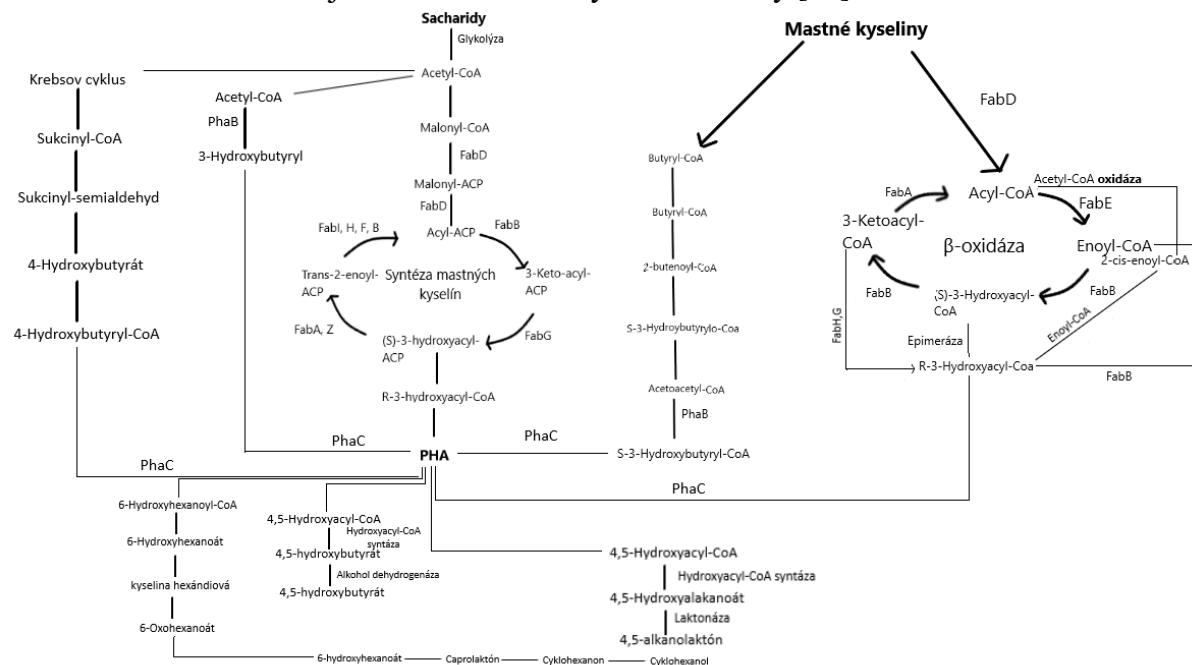
Polyhydroxyalkanoáty sa môžu syntetizovať biologicky alebo chemickou cestou, pričom prvá možnosť syntézy poskytuje PHA s výrazne vyššími molekulovými hmotnosťami v porovnaní s chemickou syntézou [[25].

PHA syntáza hrá dôležitú úlohu v polymerizačnom procese, kde sa používa (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA ako substrát pre syntézu polyhydroxyalkanoátov. Na základe zložených podjednotiek (sekvencie aminokyselín) a substrátovej špecifickosti rozdeľujeme polyesterové syntázy do 4 základných tried. Je dokázané, že triedy I, III a IV polymerizujú monomér s krátkym reťazcom, pričom trieda II využíva monoméry so strednou dĺžkou reťazca [19].

V syntéze PHA je začlenených veľa génov, ktoré kódujú rôzne enzýmy. Môže sa to diať priamo alebo nepriamo. Momentálne poznáme 8 základných metabolických dráh syntézy PHA [25].

V prvej dráhe je PHB produkovaný z acetyl-CoA sekvenčným pôsobením 3 hlavných enzýmov (kódované génmi *phaA*, *phaB*, *phaC*): 3-ketothiolázou, NADPH depedentnou acetoacetyl-CoA reduktázou a PHA syntázou. Z toho vyplýva, že acetyl-CoA je kľúčovým komponentom v dodávaní 3-hydroxyalkanoyl-CoA, ktorý hrá rolu substrátu v PHA syntéze. 3-hydroxyalkanoyl-CoA môže byť dodávaný aj z β -oxidácie mastných kyselín, pričom tieto kyseliny môžu mať rôzne dĺžky reťazca. V druhej dráhe 3-ketotioláza spája reverzibilne dva acetyl-CoA s acetoacetyl-CoA. Je prispôsobene inhibovaná vysokými koncentraciami CoASH. CoASH sa uvoľňuje, keď acetyl-CoA vstupuje do citrátového cyklu. NADPH–depedentná acetoacetyl-CoA reduktáza premieňa svoj substrát na (*R*)-(3-hydroxybutyryl)-CoA, ktorý je následne včlenený PHA syntázou do reťazca polyméru. Jednotky 3HB môžu byť taktiež

syntetizované z kyseliny maslovej cez acetyl-CoA. V tretej dráhe je zahrnutá 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferáza a malonyl-CoA. ACP transacyláza, ktorá dodáva 3-hydroxyacyl-ACP. Z neho je ďalej formovaný monomér PHA 3-hydroxyacyl-CoA. V štvrtej dráhe je využívaná NADH-depedentná acetoacetyl-CoA redutáza na oxidáciu (S)-(+)-3-hydroxybutyryl-CoA. V obrázku 5 sú znázornené aj ostatné známe biosyntetické dráhy [25].







Obrázok 5 Dráhy biosyntézy PHA [19]

2.5.5 PHA syntáza

PHA syntáza je dôležitým enzýmom pre PHA syntézu, ktorý katalyzuje polymerizáciu hydroxyacyl-CoA na polyhydroxyalkanoát. Skupina proteínov PHA syntázy je rozdelená do 4 hlavných typov na základe primárnej štruktúry, zloženia podjednotiek a špecifickosti substrátu. Medzi najznámejšie PHA syntázy patrí scl-PHA syntáza a mcl-PHA syntáza. Môže dôjsť k polymerizácii na scl aj mcl PHA len pokiaľ ide o syntázu s veľmi nízkou substrátovou špecifickosťou. Takýto príklad poskytujú niektoré baktérie rodu *Pseudomonas*, ale ide o veľmi špecifický príklad, pretože tak širokú substrátovú špecifickosť má len veľmi malé množstvo syntáz [26, 27].

I. a II. trieda sa skladajú len z podjednotky PhaC, ktorej molekulová hmotnosť sa pohybuje od 60 do 70 kDa. Syntázy I. triedy, do ktorej patrí napríklad *Cupriavidus necator*, využívajú ako substrát najmä CoA-thioestery rôznych (R)-3-hydroxy mastných kyselín, s 3 až 5 uhlíkmi vo svojej štruktúre. Naopak syntázy II. triedy využívajú CoA-thioestery (R)-3-hydroxy mastných kyselín, ktoré majú vo svojej štruktúre 6 a 1 atómov uhlíka. Syntázy III. triedy, do ktorej patrí napríklad *Allochomatium vinosum*, sú tvorené naopak dvoma podjednotkami s relatívne rovnakou molekulovou hmotnosťou, ktoré sú typicky kódované v jednom operóne. Sekvencia aminokyselín v prvej podjednotke vypovedá sekvencie syntáz I. a II. triedy – PhaC s molekulovou hmotnosťou okolo 40 kDa. Druhá podjednotka PhaE s molekulovou hmotnosťou okolo 40 kDa tieto podrobnosti nevykazuje. V rámci III. triedy využívajú syntázy ako substrát CoA-thioestery (R)-3-hydroxy mastných kyselín, ktoré majú vo svojej štruktúre 3 až 5 atómov uhlíkov. IV. trieda má podobné usporiadanie podjednotiek ako III. trieda, avšak

podjednotka PhaE je tu nahradená podjednotkou PhaR, ktorej molekulová hmotnosť je okolo 20 kDa [26, 28, 29].

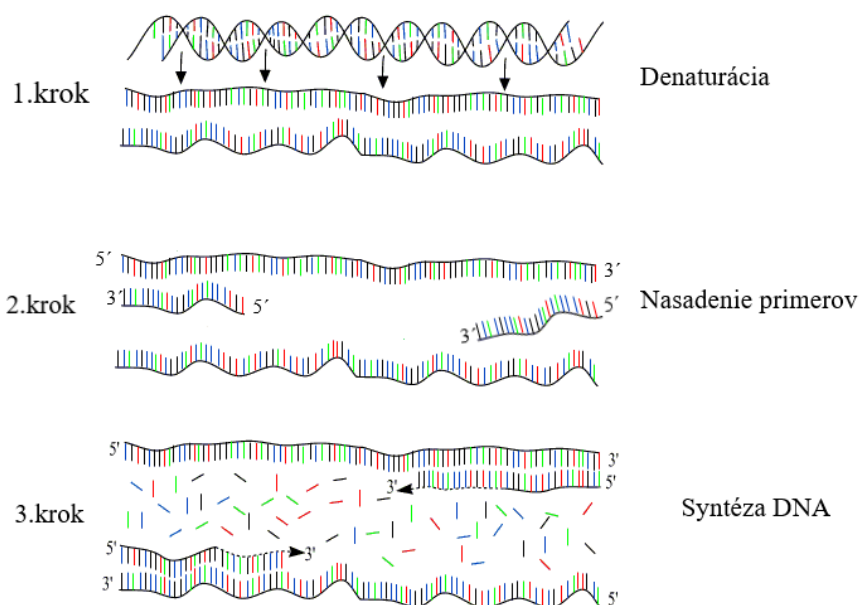
Trieda	Podjednotky	Druh	Susbtrát
I	 ~60-73 kDa	<i>Cupriavidus necator</i>	3HA _{SCl} -CoA (-C3-C5) 4HA _{SCl} -CoA 5HA _{SCl} -CoA, 3MA _{SCl} -CoA
II	 ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA _{SCl} -CoA (-C5)
III	 ~40 kDa ~40 kDa	<i>Allochrodatum vinosum</i>	3HA _{SCl} -CoA (3HA _{SCl} -CoA [-C6-C8]) 4HA-CoA, 5HA-CoA
IV	 ~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{SCl} -CoA

Obrázok 6 Prehľad PHA syntáz rôznych tried [29]

2.6 Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia, známa pod skratkou PCR patrí medzi základne molekulárne diagnostické techniky. Táto technika sa vyznačuje vysokou citlivosťou, preto je potreba pracovať v sterilných podmienkach, aby nedochádzalo ku kontaminácií reakčnej zmesi z pracovného prostredia. Patrí medzi často používané techniky. Výsledkom PCR sú amplikóny. Amplikóny sú úseky DNA o konkrétnej dĺžky – 100 až 1 000 párov báz. Prítomnosť týchto produktov sa obvykle ďalej dokazuje agarózovou alebo polykarylamidovou gélovou elektroforézou [30].

Princíp PCR je založený na syntéze určitého úseku deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) v smere 5'→3', ktorá sa cyklicky opakuje. K denaturovanej DNA (rozvoľnenie na jednoreťazce) sa pripoja primery – krátke oligonukleotidy DNA, zložené z 20–25 nukleotidoch. Kvôli svojej komplementarite sa pripoja k denaturovanej DNA. Od tohto miesta začína syntéza nového reťazca DNA. Táto syntéza je katalyzovaná DNA polymerázou, ktorá je izolovaná najčastejšie z *Thermus aquaticus*. Vzhľadom k tomu, že je tento enzým termostabilný, tak aj pri zvyšovaní teploty si uchováva svoju aktivitu. Práve cyklické zmeny teploty sa využívajú pri denaturácii DNA. Pri syntéze vzniká z molekuly s jedným reťazcom molekula s dvoma reťazcami. Dvojreťazová molekula je neskôr denaturáciou separovaná na dve molekuly s jedným reťazcom, ktoré sú v ďalšom cykle syntézy DNA polymerázou znovu doplnené na dva reťazce. Postupným opakovaním cyklov PCR môže dôjsť až k nárastu počtu 10⁹ kópií konkrétneho úseku DNA pri 30 cykloch [30].



Obrázok 7 Princíp PCR

2.6.1 Multiplex polymerázová reťazová reakcia

PCR je používaná vo viacerých modifikáciách a variantoch. PCR sa upravuje do rôznych modifikácií na základe potrieb užívateľa. Napríklad pri potrebe amplifikovať templáty s nízkym počtom kópií, pri molekulárnej identifikácii, ale aj napríklad pri modifikácii sekvencie nukleových kyselín a mnoho ďalšieho. Medzi najznámejšie a najpoužívanejšie modifikácie PCR patrí multiplex PCR, kvantitatívna real-time PCR (qPCR) a iné [31].

Mnohonásobná alebo multiplex PCR je jedna z modifikácií PCR, ktorá umožňuje detekovať a amplifikovať dva a viac úsekov súčasne. Túto mnohonásobnú detekciu a amplifikáciu je možné realizovať po pridaní viacerých primerov do reakčnej zmesi. Každá sada primerov rozpoznáva rozdielne cieľové sekvencie v jednej reakčnej zmesi. Veľkou výhodou tejto metódy sú jej nízke cenové náklady. Kvôli jej výhodám sa využíva na vyhľadávanie zmien vo veľmi dlhých úsekoch DNA a tiež na amplifikáciu vnútorných kontrol súčasne so vzorkami [31].

2.7 Biotechnológie využívajúce extrémofilné baktérie

Priemyselné biotechnológie sa zameriavajú okrem iného aj na výber optimálneho bioreaktoru vhodného ku konkrétnym procesom. Pre bioprocessy sú dôležité bioreaktory z nehrdzavejúcej oceli, pričom najdôležitejším aspektom je precízna sterilácia. Medzi cenovo najnáročnejšiu časť bioprocessov patria separačné postupy a samozrejme aj odborní, vyškolení inžinieri. Nová generácia priemyselných biotechnológií (NGIB) by bola schopná prekonať všetky vyššie zmienené nevýhody súčasnej priemyselnej biotechnológie. Dosiahla by to tak, že bioprocessné spracovanie by sa vykonávalo v nesterilných (otvorených) podmienkach, pričom by bolo možné použiť keramické, cementové alebo plastové bioreaktory. Tieto zmeny by znížili náklady investícií do zariadení a zároveň by znížovali dopyt po špeciálne vyškolených inžinieroch. Zjednodušenie bioprocessov prináša použitie extrémofilných mikroorganizmov, ktoré odolávajú kontaminácii s inými mikroorganizmami. Vzhľadom k tomu, že by nebola potreba sterilácie, tým by došlo k zníženiu spotreby vody a energie a kapitálových investícií do zariadení a vybavenia. NGIB eliminuje mnoho ďalších nevýhod, akými sú napríklad náročný vývoj jedného produktu z jedného kmeňa, pomalý rast

mikroorganizmov, nízka účinnosť premeny substrátov na produkt. Je to z toho dôvodu, že v tomto prípade môžu byť použité veľké nádoby s jednoduchými miešacími mechanizmami a nie je potreba prítomnosť komplikovaných plynových systémov. Pri anaeróbných podmienkach sa znižuje cena nákladov, pretože sa nevyžaduje prítomnosť zložitých systémov, ktoré zabezpečujú tieto podmienky [32, 33].

2.7.1 NGIB mikroorganizmy

Ak by rozvoj NGIB mal byť úspešným, v prvom rade je najdôležitejším faktorom masívny kmeň rezistentný voči inej mikrobiálnej kontaminácii. Kmeň by mal mať rýchly rast a mali by existovať metódy a nástroje molekulárneho inžinierstva na výrobu produktov. Bezpochybne by mal byť známy celý genóm kmeňa. Požiadavky na prostredie, v ktorom kmeň použitý pre NGIB rastie najrýchlejšie sú:

- 1) Extrémne podmienky (vysoká alebo nízka teplota, extrémne hodnoty pH či osmotického tlaku);
- 2) Nezvyčajné substráty (mastné kyseliny s dlhým uhlíkovým reťazcom, metanol, celulóza, plynne substráty a iné);
- 3) Vysoko koncentrované substráty a toxické chemikálie (ťažké kovy, mastné kyseliny s krátkym uhlíkovým reťazcom alebo alkoholy s krátkym reťazcom);
- 4) Nedostatočná prítomnosť vody [32].

Kmeň, ktorý disponuje s kombináciou viacerých týchto vlastností sa stáva ešte atraktívnejším pre NGIB. Niektoré mikroorganizmy archea spĺňajú tieto požiadavky, no rastú príliš pomaly, a práve preto nie sú vhodnou platformou pre NGIB. Na rozdiel od toho, mnohé prokaryotické mikroorganizmy spĺňajú vyššie zmienené požiadavky. Medzi tieto organizmy patria napríklad acidofily, psychrofil, termofily, halofily a baktérie, ktoré okrem iných substrátov využívajú aj plynne substráty a celulózu. Termofilné mikroorganizmy sú vysoko odolné voči extrémnym podmienkam akými sú chemické denaturačné činidlá alebo široký rozsah hodnôt pH. Biokatalyzátory vyizolované z termofilov – termozýmy disponujú taktiež širokou škálou výhodných vlastností. Výhodou termofilov je, že nevyžadujú veľké a drahé chladenie ich fermentačných nádob. Je to obzvlášť výhodné, keď sa substrát alebo fermentačné médium steriluje parou alebo v prípade, kedy je substrát predspracovaný teplom. Zároveň sa rýchlym miešaním vytvára dostatočné teplo potrebné na splyňovanie, prevzdušňovanie alebo na rýchly rozklad biopolymérov. Vo všeobecnosti vyššie teploty umožňujú rýchlejšie metabolické aktivity. To je spojené s použitím menšej fermentačnej jednotky pre rovnaké množstvo produktu. Tým pádom sa ušetrí čas a aj náklady. V porovnaní s mezofilnými organizmami majú termofily vyššie energetické požiadavky na údržbu. Tento fakt je výhodný vtedy, keď produkcia bakteriálnej hmoty je nízka a je vysoká konverzia substrátu na určitý produkt (napr. premena sacharidov na chemikálie). Je známe, že nižšia tvorba bakteriálnej biomasy poskytuje vyššie pomery produktu a zároveň menšiu produkciu odpadu, ktorý sa pri fermentácii nedá použiť ako vedľajší produkt [32, 33].

V súčasnosti je hlavnou úlohou NGIB identifikovať čo najlepší mikroorganizmus, ktorý má čo najväčšiu kombináciu najlepších vlastností pre novú generáciu biotechnologických procesov [32].

2.8 Súčasný stav riešenej problematiky

V dnešnej dobe sa v biotechnologickom priemysle kladie dôraz na kontrolovanú biosyntézu polyhydroxyalkanoátov z hľadiska zloženia a molekulovej hmotnosti. Kladie sa dôraz na zlepšenie účinnosti biosyntézy a na účinnejšiu akumuláciu ultra vysokomolekulárneho PHA. Jedným z hlavných dôvodov hľadania lepších biotechnologických postupov sú konkurencieschopné náklady na výrobu PHA. Metódy, ktoré vedú k tomuto pokroku sú napríklad zmeny rastu pre rýchlu proliferáciu, inžinierske metódy na zväčšenie buniek pre viac naakumulovanú PHA, preprogramovanie dráh biosyntézy, presmerovanie metabolického toku na syntézu PHA pomocou nástroja CRISPR Cas9 a v neposlednom rade využitie netradičných hostiteľov, ktoré znižujú zložitosť produkcie PHA. Navrhuje sa, aby najmä baktérie, ktoré sú odolné voči kontamináciám, boli najviac používaným mikroorganizmom v bioinžinierstve. Pomocou baktérií je možnosť dosiahnuť nové vlastnosti pre efektívnu produkciu PHA a ich aplikáciu [34].

Vo výskume *G. Chena a kol.* sa skúmal pokrok dosiahnutý v posledných rokoch s úlohou zlepšiť účinnosť PHA biosyntézy s cieľom ekonomickej produkcie polyhydroxyalkanoátov [34].

Je potreba zdôrazniť, že biosyntéza konkuruje využívaním zdrojov iným metabolickým dráham a medziproduktom a preto, ak chceme zvýšiť účinnosť biosyntetickej dráhy, je potreba oslabiť iné „konkurenčné“ dráhy. Oslabenie jednej metabolickej cesty môže zapríčiniť vyššiu produkciu polyhydroxybutyrátu. Jedným z príkladov môže byť syntéza kopolyméru PHBV, kedy sa na biosyntézu pridá propionát za vzniku 3-hydroxyvalerátu. Propionát je avšak spotrebovaný aj 2-methylcitrátovým cyklom MCC. Odstránenie génu *prpC*, kódujúci enzým na premostenie propionyl-CoA na MCC cyklus, výrazne zlepšuje konverziu propionátu na 3HV. Ďalším príkladom zvýšením produkcie PHA je použitie mastných kyselín ako prekursorov na syntézu mcl-PHA. β -oxidácia, ktorá spotrebuje mastné kyseliny, by sa v tomto prípade mala oslabiť alebo odstrániť, aby sa zvýšila syntéza PHA [34].

Ďalším spôsobom, ako zvýšiť syntézu PHA je zväčšenie buniek. Vzhľadom k tomu, že PHA sú inklúzne telieska uložené v malých intracelulárnych priestoroch, je množstvo a veľkosť PHA priamo úmerná veľkosti intracelulárnym priestorom. Jedným z príkladom je baktéria *E.coli*, pri ktorej sa zistilo, že na dosiahnutie vláknitého tvaru sa predlžuje v momente, keď sa inhibuje štiepny proteín *FtsZ*. Tým, že sa bunky predlžujú, vytvárajú tým viac priestoru na hromadenie granúl PHA. Rovnako *E. coli* uchováva v sebe väčšie množstvo PHA, keď sa priemer bunky zväčšil o 2–5 záhybov. Toto zväčšenie nastalo v dôsledku oslabenia proteínu kostrového skeletu *MreB*. Oslabenie *FtsZ* a *MreB* pomocou CRISPRi metódy bunky vykazovali rozmanité morfológické tvary (tyčinky, vretená, viacnásobné uholníky, elipsoidy). Výsledky, ktoré sa dosiahli na *E. coli* pomocou metódy CRISPRi boli úspešne dokázané aj na priemyselne zaujímavejšom kmene *Halomonas campaniensis*. Zväčšenie veľkosti bunky nielenže zvyšujú akumuláciu PHA, ale aj zvyšujú premenu substrátu na PHA. Taktiež na zníženie ceny na náklady je vhodné použiť gravitačnú separáciu buniek obsahujúcich PHA [34].

Jednou z metód, ktorá sa úspešne používa na riadenie metabolického toku na biosyntézu PHA je metóda CRISPRi, ktorá je odvodená z CRISPR/Cas9. V štúdií *W. Tao a kol.* použili metódu CRISPRi na potlačenie konkurenčnej dráhy, ktorá spotrebuje propionát na vytvorenie 3HV. Znížením spotreby acetyl-CoA v cykle TCA sa viac acetyl-CoA spotrebovalo na syntézu PHB. Týmto potlačením sa zlepšila účinnosť premeny substrátu [35].

Ďalším faktom je, že aktivita PHA syntázy ovplyvňuje molekulovú hmotnosť polyhydroxyalkanoátov. Opäť metódou CRISPRi sa dá dokázať regulovať aktivita PhaC [34].

Technológie bioinžinierstva, ktoré zahŕňujú konjugčné postupy, chromozómové inžinierstvo, CRISPR/Cas9, boli vyvíjané pre termofilný druh baktérií *Halomonas spp.* Tento vývoj umožnil produkciu viacerých produktov a zároveň umožňuje kontrolovateľné morfológické inžinierstvo. Vzhľadom k tomu, že PHA je sypký materiál, náklady predstavujú problém pre rozsiahle aplikácie. Na zníženie týchto výrobných nákladov by mal NGIB byť zameraný na extrémofilné baktérie, ktoré znižujú spotrebu energie, vody a taktiež je nevyhnutné zjednodušiť celý proces. **X.R. Jiang a kol.**, rovnako ako iné vedecké tímy, pracoval na zdokonaľovaní mikroorganizmov k produkcii PHA. Tým by sa zachovala konzistencia procesu a kvality PHA. Vzhľadom k tomu, že substráty – najmä zdroj uhlíka, tvoria najväčšiu časť nákladov na syntézu polyhydroxyalkanoátov, je potreba zadovážiť čo najväčšiu účinnosť premeny substrátu na PHA. K dosiahnutiu tohto cieľa je potreba navrhnúť extrémofilov tak, aby tok zdroja uhlíka smeroval viac k syntéze PHA, než na rast buniek. Design baktérií syntézy PHA *in situ* by mal byť možný vďaka rýchlemu vývoju syntetickej biológie. Navrhnutá extrémofilná baktéria by mala byť schopná vykonávať vysoko účinnú akumuláciu PHA indikovateľnú pod limitom kyslíku. Budúcnosť syntézy polyhydroxyalkanoátov je v prepracovaných extrémofilných baktériách, ktoré sú schopné produkovať vysoký obsah PHA vo veľkých veľkostiach bunky. V budúcnosti by výroba PHA v NGIB mala konkurovať petrochemickým plastom [34, 36, 37].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

V rámci experimentálnej časti bakalárskej práce boli realizované experimenty s kmeňmi *Chelatococcus daeguensis* (DSM 22069) a *Tepidiphilus thermophilus* (DSM 27220). Experimenty boli založené na profilácii ideálnych podmienok pre vyššie uvedené kmene termofilných baktérií, kedy baktérie sú schopné produkovať čo najväčšie množstvo PHB. Boli pozorované hodnoty množstva biomasy a hodnoty zastúpenia polyhydroxyalkanoátov v biomase. Nastavenie podmienok bolo zamerané na teplotu, zdroj uhlíka a použitie správnych prekursorov pre tvorbu kopolyméru P(3HB-co-3HV).

3.1 Použité baktérie, chemikálie a prístroje

3.1.1 Použité baktérie

V experimentálnej časti práce boli použité nemecké zbierkové bakteriálne kmene *Chelatococcus daeguensis* DSM 22069 a *Tepidiphilus thermophilus* DSM 27220 zakúpené v Leibnitz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Braunschweig, Nemecko.

3.1.2 Použité chemikálie na kultiváciu mikroorganizmov

Chelatococcus daeguensis:

- Agar powder, Bacteriological (HiMedia, IND)
- Nutrient Broth w/1% peptone (HiMedia, IND)
- Tryptone soya broth (OXOID, UK)
- Yeast Extract Powder (HiMedia, IND)

Tepidiphilus thermophilus:

- Agar powder, Bacteriological (HiMedia, IND)
- Beef Extract Powder (HiMedia, IND)
- Peptone, Bacteriological (HiMedia, IND)

3.1.3 Použité komponenty pre izoláciu DNA, PCR a agarózovú gélovú elektroforézu

- Agaróza (Serva, SRN)
- DNA standard – FastGenne 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs, UK)
- Etyléndiamíntetraacetát sodný (Lach-Ner, ČR)
- Glycerol (Lachema, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, ČR)
- Master mix One *Taq* Hot Start (2x koncentrovaný) (New England BioLabs, UK)
- MgCl₂ (Thermo Scientific, USA)
- Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, SRN)
- PCR loading buff, Yellow load (Top-Bio, UK)
- Tris (hydroxymetyl) aminometán (Lach-Ner, ČR)

3.1.4 Ostatné chemikálie

- 1,4-butandiol (Fluka, Deu)

- Citrát železito-amónny (Fluka, ČR)
- D-glukóza monohydrát g.r. (Lach-Ner, ČR)
- Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner, ČR)
- Dihydrát chloridu vápenatého (Lachema, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, DEU)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich, DEU)
- Fruktóza (Lach-Ner, ČR)
- Glycerol bezvodý (Penta, ČR)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (Sigma-Aldrich, DEU)
- Chlorid amónny (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid draselný (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid sodný (Lach-Ner, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, ČR)
- Kyselina levulová, (GFBiochemicals, USA)
- Kyselina valerová (Sigma-Aldrich, DEU)
- Síran amónny (Lach-Ner, ČR)

Všetky použité chemikálie boli v čistote p. a. a vyššie.

3.1.5 Použité prístroje

- Analytické váhy ew 620-3NM, (KERN)
- Centrifuga Hettich EBA20, (MANEKO)
- Centrifuga Sartorius Weender Landestrasse, (Sigma Santorius)
- Laminárny box Aura mini, (Bio air instruments)
- ELISA reader ELx808, (BioTek)
- Magnetická miešačka bez ohrevu technoKartell, (MERCİ s.r.o.)
- Magnetická miešačka Magnetic stirrer, (BIOSAN)
- Nanofotometr P 300, (Implen)
- Plynový chromatograf s FID, (Thermo Scientific, Trace 1300; kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm)
- Temperovaná trepačka Incubator 1 000, (Heidolph)
- Temperovaná trepačka KS4000, (IKA)
- Temperovaná trepačka (inkubátor) Orbital Shaker ES-20, (Biosan)
- Termoblok Block heater SBH130D, (Stuart)
- Vortex BENCHMIXER, (Benchmark Scientific Inc.)
- Bežné laboratórne sklo a vybavenie

3.2 Kultivácia baktérií *Chelatococcus daeguensis* a *Tepidiphilus thermophilus*

3.2.1 Príprava inokula a priebeh kultivácie

Inokulá bakteriálnych kmeňov *Chelatococcus daeguensis* a *Tepidiphilus thermophilus* boli pripravené v objeme 50 ml do 100 ml Erlenmeyerových baniek, vždy v dvoch paralelných prevedeniach. Následne kultivácia prebiehala na temperovaných trepačkách pri teplotách 37 °C a 50 °C a 180 rpm. Po 24 hodinách nasledovalo preočkovanie na produkčné média.

3.2.2 Príprava živných médií

Na prípravu bakteriálneho inokulá pre bakteriálny kmeň *Chelatococcus daeguensis* bolo pripravené a použité univerzálne tekuté minerálne médium – Nutrient Broth v koncentrácii 25 g/l. Zloženie média Nutrient Broth:

- Pepton	10,00 g
- Beef Extract	10,00 g
- NaCl	5,00g
- Destilovaná voda	1 000 ml

Na prípravu bakteriálneho inokula pre bakteriálny kmeň *Tepidiphilus thermophilus* boli pripravené tekuté minerálne média v zložení:

- Pepton	15,00 g
- Beef Extract	3,00 g
- NaCl	6,00 g
- Glukóza	1,00 g
- Destilovaná voda	1 000 ml

Navážka inokulačného média bola rozpustená v destilovanej vode a sterilácia prebiehala v tlakovom hrnci s uzavretým ventilom. Po sterilácii boli média ochladené na laboratórnu teplotu a zaočkované z Petriho misky. Očkovanie prebiehalo v sterilnom laminárnom boxe pomocou sterilnej bakteriologickej kľučky, a to celkom trikrát, kedy bolo vždy prenesené malé množstvo narastených kolónií. Zaočkované inokulá boli kultivované na temperovanej trepačke.

Bakteriálne inokulá boli následne preočkované na produkčné médium kvôli dosiahnutiu biomasy s vysokým obsahom polyhydroxyalkanoátov. Ako produkčné média boli použité minerálne média s vysokým obsahom zdroja uhlíka. Minerálne médium sa pripravovalo v dvoch paralelných prevedeniach do 250 ml Erlenmayerovej banky v objeme 100 ml. Pre oba bakteriálne kmene bolo použité totožné minerálne médium so zložením:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	9,00 g
- KH_2PO_4	1,50 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,20 g
- NH_4Cl	1,00 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g
- Fe (III) NH_4 – citrát	0,001 2 g
- Zdroj uhlíka	20,00 g
- Roztok TES	1 ml
- Destilovaná voda	1 000 ml

Zloženie roztoku stopových prvkov TES:

- EDTA	50,00 g
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	13,80 g
- ZnCl_2	0,84 g
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,13 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,10 g

- $\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,016 g
- H_3BO_3 0,10 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

Pre bakteriálny kmeň *Chelatococcus daeguensis* bola ako zdroj uhlíka v minerálnom médiu použitá glukóza s koncentráciou 20 g/l a pre bakteriálny kmeň *Tepidiphilus thermophilus* bol zdrojom uhlíka glycerol opäť v koncentracii 20 g/l.

Zásobné roztoky glycerolu, glukózy a stopových prvkov boli pripravené a sterilované osobitne. Pričom nádoba so stopovými prvkami sa sterilovala v parnom hrnci so zatvoreným ventilom a zásobný roztok glycerolu a glukózy sa steriloval v parnom hrnci s otvoreným ventilom. Po príprave produkčných médií boli roztoky sterilované v tlakovom hrnci s uzavretým ventilom.

Po vychladnutí vysterilovaných minerálnych médií na laboratórnu teplotu bolo do jednotlivých médií pridané príslušné množstvo glycerolu, glukózy a stopových prvkov TES. Následne sa do pripravených produkčných médií zaočkovali príslušné bakteriálne inokulá v množstve 10 % z objemu média. Pridanie dodatočného obsahu produkčného média a zaočkovanie prebiehalo v sterilných podmienkach v laminárnom boxe.

Zaočkované minerálne média boli 72 hodín kultivované na temperovaných trepačkách pri teplote 37 °C (*Chelatococcus daeguensis*) a 50 °C (*Tepidiphilus thermophilus*) a 180 rpm.

3.3 Príprava roztokov

3.3.1 Príprava lyzačného pufru

Príprava lyzačného pufru: Tris(hydroxymetyl)aminometán 5mM s pH 8,5:

V príprave vzoriek na PCR boli pripravené hrubé DNA lyzáty, bez prečistenia. Príprava lyzačného pufru pozostávala s návažky 0,06 g Tris(hydroxymetyl)aminometánu, ktorá bola rozpustená v 80 ml destilovanej vody a následne bolo pH upravené HCl na hodnotu 8,5. Roztok bol doplnený na objem 100 ml, následne bol vysterilovaný a zamrazený na ďalšie použitie.

3.3.2 Príprava TBE pufru na gélovú elektroforézu

Na prípravu 10krát koncentrovaného TBE pufru bolo použité:

- Tris(hydroxymetyl)aminometán 108,00 g
- H_3BO_3 55,00 g
- EDTA 9,30 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

3.3.3 Príprava fosfátového pufru (PBS)

Na prípravu fosfátového pufru bolo použité:

- NaCl 8,00 g
- KCl 0,20 g
- KH_2PO_4 0,24 g
- $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,44 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

3.3.4 Príprava 2 % agarózového gélu pre elektroforézu

K navážke 2 g agarózy bol pridaný pripravený roztok 1krát koncentrovaného TBE pufru v objeme 100 ml. Následne bola pripravená zmes opakovane zahrievaná v mikrovlnnej trúbe až do úplného rozpustenia všetkej navážky agarózy. Po ochladení na teplotu 70 °C bolo do roztoku pridaných 5 µl Midori Green. Po zamiešaní bol gél naliaty do vane na elektroforézu, v ktorej bol vopred vložený hrebienok na tvorbu jamiek. Po vychladnutí gélu bol hrebienok vytiahnutý a v prípade potreby bol gél uchovaný v roztoku TBE pufru v chladničke.

3.4 Použité metódy

3.4.1 Izolácia bakteriálnej DNA pomocou tepelnej lýzy

Do Eppendorfovej skúmavky bolo pomocou automatickej pipety napipetovaných 100 µl vopred pripraveného lyzačného pufru v aseptickom prostredí (laminárneho boxu). Potom sa pomocou sterilnej jednorazovej bakteriologickej kľučky pridali do skúmavky bunky a zmes bola premiešaná. Následne prebiehala inkubácia pri 99,9 °C po dobu 15 minút v termobloku. Po inkubácii boli vzorky centrifugované pri 10 000 rpm po dobu 10 minút. Supernatant, v objeme 60 µl, bol prepipetovaný do nových eppendorfových skúmaviiek.

3.4.2 Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácia DNA

Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie DNA bolo robené na nanofotometre. Ako blank bol použitý lyzačný pufer o objeme 3 µl. Po nastavení nanodropu boli zmerané vzorky izolovanej DNA, pričom pri nanášaní vzoriek bol použitý rovnaký objem – 3 µl. Po zmeraní bola odčítaná hodnota koncentrácie DNA v ng/µl. Ak je koncentrácia DNA vo vzorke dostatočná, dá sa koncentrácia DNA stanoviť aj priamou fotometriu v UV oblasti. Pre stanovenie čistoty DNA bol použitý pomer A_{260}/A_{280} . V ideálnom prípade je nutné, aby pomer dosiahol hodnotu 1,800. Ak je hodnota nižšia ako hodnota 1,800, vzorka je znečistená vysokým obsahom proteínov. Vyššia hodnota indikuje prítomnosť RNA.

3.4.3 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Prostredníctvom polymerázovej reťazovej reakcie sa amplifikovali fragmenty DNA o veľkosti 1 500 bp. Na túto amplifikáciu boli použité primery 16S-F a 16S-R, ktoré boli navrhnuté a syntetizované firmou Generi-Biotech. Sú to primery génu *16S rRNA*, ktorými sa potvrdí prítomnosť bakteriálnej DNA. Súčasne bola prevedená amplifikácia fragmentov DNA o veľkosti 551 bp pomocou primerov G-D a G₁-R. Tieto konkrétne primery selektívne amplifikujú gén *phaC*. Pri každej reakcii bola zároveň použitá pozitívna a negatívna kontrola, kde pozitívna kontrola obsahovala bakteriálnu DNA izolovanú z PHA produkujúceho kmeňa *Cupriavidus necator* H16, pri ktorej je potvrdená prítomnosť génu *phaC*. V prípade negatívnej kontroly bola vzorka DNA nahradená PCR vodou.

Tabuľka 4 Sekvencia báz primerov použitých v PCR

Gén	Veľkosť [bp]	Primer	Sekvencia báz
<i>16S rRNA</i>	1500	16S-F	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG
		16S-R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T
<i>phaC</i>	551	G-D	GTG CCG CCS YRS ATC AAC AAG T
		G ₁ -R	GTT CCA GWA CAG SAK RTC GAA

3.4.3.1 Príprava vzoriek pre PCR

PCR zmes amplifikujúca gény *16S rRNA* a *phaC* obsahovala:

- Mastermix	12,50 µl
- G-D a G ₁ -R primery	0,50 µl (2x)
- 16S-F a 16S-R primery	0,50 µl (2x)
- DNA	2,00 µl
- MgCl ₂	2,60 µl
- Sterilná voda	5,90 µl
Celkový objem	25,00 µl

3.4.3.2 Nastavenie termocyklieru

Pre PCR amplifikáciu génov *16S rRNA* a *phaC* bol využitý termocykler s parametrami uvedenými v tabuľke 5.

Tabuľka 5 Teplotný program PCR termocyklieru amplifikujúceho gény *16S rRNA* a *phaC*

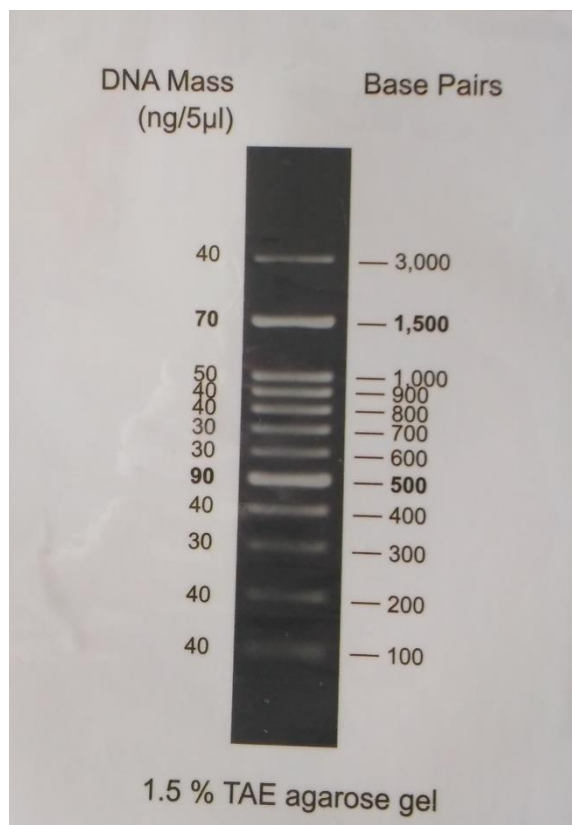
Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklov
1.	94	30	1
2.	94	30	30
	55	30	
	68	90	
3.	68	300	1
	30	60	1

3.4.3.3 Stanovenie PCR produktu pomocou agarózovej gélovej elektroforézy

Do jamiek vopred pripraveného 2% agarózového gélu bola napipetovaná zmes v objeme 10 µl, ktorá bola pripravená ako zmes 3 µl nanášajúceho pufru (PCR loading buff) a 10 µl PCR produktu. Zároveň bol napipetovaný štandard v objeme 5 µl s presne definovanou veľkosťou fragmentov bez použitia nanášajúceho pufru. Následne sa gél vložený do elektroforetickej vane prekryl vrstvou 1krát koncentrovaného TBE pufru. Následne bola aparatúra pripojená k zdroju, elektroforetická separácia následne prebiehala pri napätí 90 V po dobu 50 minút. Po skončení vyvíjania elektroforézy bol gél vybratý z TBE pufru a pozorovaný pod UV transluminátorom.

3.4.3.4 Veľkostné štandardy

Na stanovenie veľkosti produktov polymerázovej reťazovej reakcii pomocou agarózovej gélovej elektroforézy bol použitý štandard s presne definujúcimi fragmentami DNA (viď obrázok 8).



Obrázok 8 DNA štandard 100 bp

3.4.4 Stanovenie množstva biomasy

Po kultivácii sa stanovovalo množstvo biomasy spektrofotometricky a gravimetricky. Následne pokračovalo stanovenie obsahu a zastúpenie polyhydroxyalkanoátov vo vzorkách vysušenej biomasy.

3.4.4.1 Stanovenie obsahu biomasy spektrofotometricky

Obsah biomasy bol stanovovaný spektrofotometricky pomocou merania intenzity zákalu na spektrofotometre pri 630 nm. Ako blank bola použitá destilovaná voda. Vzhľadom k tomu, že sa nejedná o veľmi presnú metódu, výsledky zo spektrofotometrického stanovovania obsahu biomasy boli použité len na zrovnávanie.

Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie biomasy sa stanovovalo vhodným nariadením suspenzie buniek v minerálnom médiu destilovanou vodou. Riedilo sa tak, aby nameraná absorbancia nepresahovala hodnotu 1, pričom výsledný objem meranej suspenzie bol 3 ml. Následne sa nariadené vzorky merali v troch paralelných meraniach.

3.4.4.2 Stanovenie obsahu biomasy gravimetricky

Z každého jednotlivého minerálneho média bolo odobratých 10 ml vzorky do centrifugačnej skúmavky. Následne sa centrifugovalo pri 6 000 rpm po dobu 5 minút. Po stočení sa supernatant odlial a bolo pridaných 0,5 ml vody čím sa sediment rozosuspendoval a premyl. Po rozuspendovaní bol obsah skúmavky kvantitatívne prevedení do vopred zvážených, čistých eppendorfových skúmaviek. Eppendorfové skúmavky s obsahom boli opäť centrifugované pri 10 000 rpm po dobu 5 minút. Po vyliatí supernatantu sa následne skúmavky sušili pri 70 °C do konštantnej hmotnosti. Vzorky boli pripravené opäť v paralelnom prevedení.

Po vysušení obsahu biomasy boli skúmavky opäť zvážené a bola stanovená koncentrácia biomasy v pôvodných vzorkách v g/l.

3.4.5 Stanovenie zloženia a množstva PHA v biomase

Kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie polyhydroxyalkanoátov vo vysušenej biomase bolo robené prostredníctvom plynovej chromatografie s plameňovo ionizačným detektorom – GC-FID. Princípom analýzy je kyslo katalyzovaná hydrolýza polyesteru a následná transesterifikácia monomérnych jednotiek. Tým sa polyméry naštiepia a vznikajú 3-hydroxyalkanové kyseliny, ktoré sa prevedú na viac prchavé metylestery, ktoré sa dajú zmerať prostredníctvom GC-FID.

3.4.5.1 Príprava štandardov pre stanovenie kalibračnej závislosti

Kalibračná závislosť obsahu 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu v neznámych vzorkách bola stanovená prostredníctvom GC-FID analýzou štandardov o známych množstvách monomérov.

Do vopred pripravenej šrovmovacej vialky bolo navážené konkrétne množstvo komerčne dostupného kopolyméru P(3HB-*co*-3HV), ktorý obsahoval 12mol. % 3HV, a k nemu bol napipetovaný chloroform v objeme 4 ml. Uzavretá a dobre premiešaná vialka bola umiestnená do termobloku, kde bola udržiavaná teplota 70 °C po dobu asi 20 minút, kým nenastalo úplne rozpustenie granulátu. Po vychladnutí vialky na laboratórnu teplotu bolo do krimpľovacích vialiek napipetované objemy 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 ml zmesi kopolyméru. Následne sa postupne k týmto objemom pridával chloroform o objeme 1 ml. Ku vytvorenej rade štandardov bolo pridaných 0,8 ml transesterifikačnej zmesi (15 % kyselina sírová v metanole a 5 mg/ml kyseliny benzoovej – interný štandard). Uzavreté vialky sa umiestnili na 3 hodiny do termobloku, kde prebiehala esterifikácia pri teplote 94 °C. Po skončení inkubácie boli vialky ochladené na laboratórnu teplotu a obsah vialiek bol extrahovaný 0,5 ml 0,5M roztoku hydroxidu sodného. V momente keď došlo k oddeleniu fáz, bolo do nových vialiek napipetovaných vždy 950 µl chloroformu spolu s 50 µl spodnej chloroformovej fáze. Vialky boli ihneď zaviečkované, aby sa predišlo k prchaniu pripravených roztokov. Následne bola táto rada roztokov na stanovenie kalibračnej závislosti analyzovaná na plynovom chromatografe s FID detektorom.

3.4.5.2 Príprava vzoriek pre GC-FID analýzu PHA

Do krimpovacích vialiek bolo na analytických váhach navážené približne 10 mg vysušenej biomasy. Následne bolo pridaných 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikačnej zmesi, ktorá obsahovala 15% H₂SO₄ v metanole a 5 mg/ml kyseliny benzoovej. Vialky boli dôkladne zazátkované a vložené do termobloku, kde pri teplote 94 °C, počas 3 hodín prebiehala esterifikácia. Po vychladnutí vialiek na laboratórnu teplotu bol ich obsah prevedení do skrutkovacích vialiek o objeme 4 ml s 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH, zmesi boli poriadne premiešané, aby došlo k extrakcii polutantov analytu do vodnej fáze. Po oddelení jednotlivých fáz a ich vyčírení sa odpipetovalo 50 µl spodnej chloroformovej fázy s obsahom metylestero 3-hydroxyalkanových kyselín do nových vialiek s 950 µl chloroformu. Takto pripravené vialky sa uzavreli a spoločne so štandardmi sa stanovovali pomocou GC-FID. Vzorky boli opäť pripravované v dvoch paralelných prevedeniach.

3.4.6 Stanovenie využitia vybraných substrátov na ELISA reader

Cieľom tohto merania bolo posúdiť schopnosť využitia konkrétnych substrátov pri 72 hodinovej submerznej kultivácii.

Vopred boli pripravené substráty o konkrétnych koncentráciách. Hodnota pH bola upravená pomocou 30 % NaOH na hodnotu 7 pri vzorkách kyseliny valerovej a levulovej. Zoznam použitých vybraných substrátov je uvedený v tabuľke 6.

Tabuľka 6 Zoznam substrátov a ich koncentrácia

20 g/l	4 g/l	8 g/l
Fruktóza	Acetát sodný	ϵ -kaprolaktón
Glukóza	Propionát sodný	1,4-butandiol
Sacharóza	Kyselina valerová	1,6-hexandiol
D-xylóza	Kyselina levulová	γ -butyrolaktón
Laktóza		
Galaktóza		
Glycerol		
Slnecnicový olej		

Pre oba bakteriálne kmene boli použité najvhodnejšie minerálne média o 1,5x koncentrovanejšie oproti normálu. Asepticky bolo do médii napipetované príslušné roztoky stopových prvkov potrebných pre rast pomocou multikanálovej pipety a množstvo 100 μ l napipetované do jamiek doštičky. Následne bolo pridaných 50 μ l príslušného substrátu o danej koncentrácii podľa tabuľky 6. Nakoniec boli média so substrátmi zaočkované 20 μ l inokula do jamiek sterilnej mikrotitračnej doštičky. Doštička bola opatrená víčkom a na ELISA readeru boli premerané vstupné hodnoty absorbancie pri 630 nm (intenzita zákalu – OD630). Okrem vzoriek bol pripravený blank v objeme 170 μ l. Po zmeraní OD630 doštičky s kultúrami boli kultivované pri teplote 37 °C (*Chelatococcus daeguensis*) a 50 °C (*Tepidiphilus thermophilus*) po dobu 72 hodín. Po kultivácii bola opäť premeraná OD630. Všetky vzorky boli pripravené v triplikátoch, aby mali dáta štatisticky výpovednú hodnotu.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Stanovenie schopnosti bakteriálneho kmeňa produkovať PHA pomocou molekulárnej biologickej metódy

Pri stanovení schopnosti bakteriálneho kmeňa produkovať PHA pomocou molekulárne biologických metód bola použitá metóda polymerázovej reťazovej reakcie – PCR. Pomocou PCR bolo genotypovo potvrdená schopnosť kmeňa *Chelatococcus daeguensis* a *Tepidiphilus thermophilus* produkovať PHA na základe detekcie amplifikovaného génu *phaC*.

Súčasťou prípravy vzoriek pre PCR bola izolácia bakteriálnej DNA bez prečistenia. Následne sa zmerala čistota a koncentrácia DNA na nanofotometri podľa pomeru absorbancie pri 260 a 280 nm. Výsledky čistoty a koncentrácie DNA sú zhrnuté v tabuľke 7 a

Tabuľka 8.

Tabuľka 7 Koncentrácia a čistota vyizolovanej bakteriálnej DNA kmeňa *Tepidiphilus thermophilus*

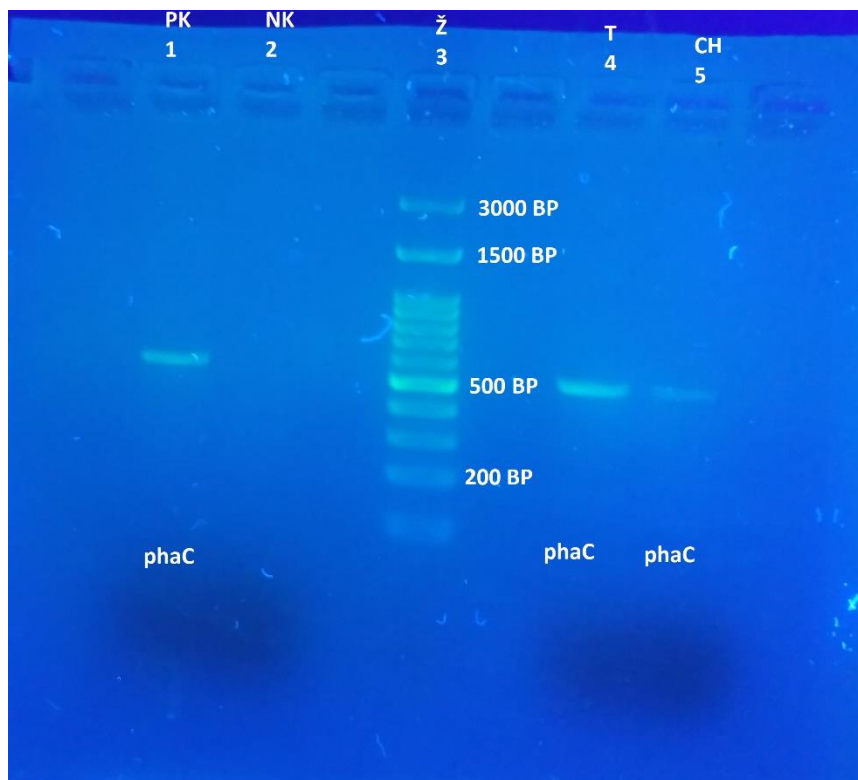
c [ng·μl ⁻¹]	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$ [-]
55,6	1,914

Tabuľka 8 Koncentrácia a čistota vyizolovanej bakteriálnej DNA kmeňa *Chelatococcus daeguensis*

c [ng·μl ⁻¹]	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$ [-]
7,014	3,500

Ako môžeme vidieť v tabuľke 7 a tabuľke 8 hodnoty koncentrácie vyizolovanej bakteriálnej DNA pre kmeň *Tepidiphilus thermophilus* sú výrazne väčšie a zároveň aj čistota DNA je výrazne lepšia ako pri kmeni *Chelatococcus daeguensis*. Mohlo to byť spôsobené tým, že lýza buniek bola prevedená pri 99,9 °C, čo spôsobilo čiastočné poškodenie DNA kmeňa *Chelatococcus daeguensis*. Tento fakt nadobúda možnosť zabráneniu domnievanej denaturácie DNA znížením lyzačnej teploty na 90 °C.

Na amplifikáciu génu *phaC* bola použitá multiplex PCR, ktorá využíva viac primerov v jednej reakcii. Bolo to z dôvodu detekcie génu *16S rRNA*, čo viedlo ku kontrole izolácie a súčasne prebiehala aj detekcia *phaC* génu. Multiplex PCR a následná detekcia bola vykonaná podľa postupu z kapitoly 3.4.3.



Obrázok 9 Agárózová gélová elektroforéza produktu PCR. Bakteriálne bunky *C. necator* H16 - pozitívna kontrola (1), negatívna kontrola – použitie vody namiesto DNA (2), *Tepidiphilus thermophilus* (4), *Chelatococcus daeguensis* (5) a DNA štandard (3)

Na obrázku 9 môžeme vidieť dostatočne viditeľné bendy PHA syntázy I. triedy, na rozdiel od génu *16S rRNA* o veľkosti cca 1500 bp, ktorý je prítomný u všetkých baktériách. Nastala preferenčná amplifikácia génu o veľkosti 500 bp ako u pozitívnej kontroly, tak aj u oboch mikroorganizmov. Tento jav je jeden z rizík použitia multiplex PCR. Mohlo dôjsť ku kompetícii o zložky PCR zmesi, čo mohlo byť zapríčinené pomerom koncentrácie primerov pre jednotlivé úseky. V tomto prípade by bol gén *16S rRNA* detegovaný v neprítomnosti génu *phaC* a súčasne by bola prítomná bakteriálna DNA vo vzorke. Ak by bolo nutné predísť tomuto javu, bolo by za potrebu zvýšiť koncentráciu primerov pre gén *16S rRNA*, z toho vyplýva následná optimalizácia. Keďže v tomto prípade bolo nadradené detegovať gén *phaC* (ktorý je prítomný len v bakteriálnej DNA), a gén *16S rRNA* slúžil len ako kontrola, môžeme považovať výsledok za relevantný. Výsledok detekcie produktu PCR na agarózovej gélovej elektroforéze potvrdzuje prítomnosť génu *phaC* u oboch vzorkách bakteriálnych kmeňov a teda aj potenciálnu schopnosť kmeňa *Tepidiphilus thermophilus* a *Chelatococcus daeguensis* produkovať PHA.

4.2 *Tepidiphilus thermophilus*

Po genotypovom potvrdení produkcie polyhydroxyalkanoátov nasledovala optimalizácia podmienok, pri ktorých sa kládol dôraz na nárast biomasy a podiel PHA v biomase. Optimalizácia bola zameraná na štúdium teploty, optimálny výber cukru ako zdroju uhlíka a vplyv prekursoru na tvorbu PHA.

4.2.1 Stanovenie optimálnej teploty na nárast biomasy a podiel PHA

Na optimalizovanie teploty sa ako kultivačné médium použilo médium o zložení, ktoré bolo zmieňované v kapitole 3.2.2., následne sa po 72 hodinovej kultivácii pri teplotách 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C a 65 °C na spektrofotometri zmerala optická hustota paralelných vzoriek.

Tabuľka 9 Stanovenie optickej hustoty spektrofotometrickou metódou pri rôznych kultivačných teplotách u baktérii *Tepidiphilus thermophilus*

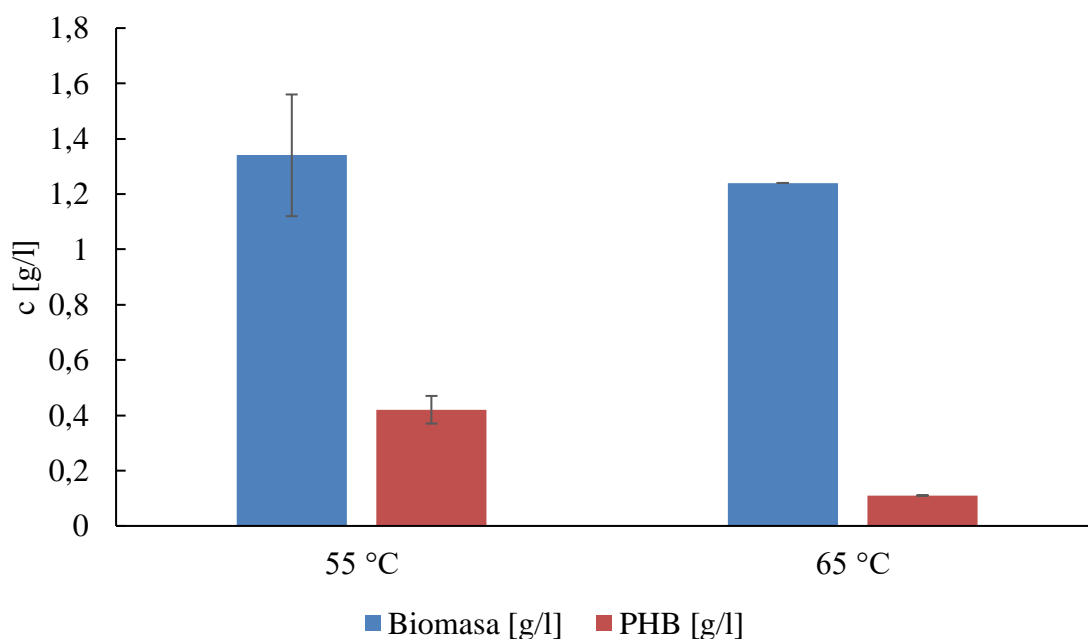
Teplota [°C]	OD630 [-]
45	0,059 ± 0,002
50	0,054 ± 0,002
55	1,963 ± 0,069
60	0,039 ± 0,002
65	1,087 ± 0,111

Po vyhodnotení stanovenia optimálnej teploty na nárast biomasy pomocou spektrofotometrickej metódy bola najväčšia hodnota optickej hustoty pozorovaná pri teplote 55 °C, preto môžeme túto teplotu považovať ako najvhodnejšiu pre rast.

Následne bola stanovená koncentrácia biomasy, PHB a percentuálny obsah PHB v sušine prostredníctvom GC-FID z dvoch paralelných vzoriek minerálnych médií kultivovaných 72 hodín pri rôznych teplotách.

Tabuľka 10 Stanovenie koncentrácie biomasy, PHB a percentuálny obsah PHB v sušine pri rôznych kultivačných teplotách u baktérii *Tepidiphilus thermophilus*

Teplota [°C]	Biomasa [g/l]	PHB [g/l]	Obsah PHB v sušine [%]
45	-	-	-
50	-	-	-
55	1,34 ± 0,22	0,42 ± 0,05	31,50
60	-	-	-
65	1,24	0,11	8,87



Graf 1 Stanovenie koncentrácie biomasy a PHB pri rôznych kultivačných teplotách u baktérii *Tepidiphilus thermophilus*

Počas experimentu sa nepodarilo získať dostatočné množstvo biomasy (8–10 mg) pri vzorkách, ktoré boli kultivované pri teplote 45 °C, 50 °C a 60 °C. Preto tieto vzorky neboli stanovené GC-FID. V dvoch paralelných prevedeniach vzoriek pri 55 °C a jednej vzorky pri 65 °C (malé množstvo biomasy) bolo ďalej pomocou plynovej chromatografie stanovená koncentrácia biomasy, PHB a percentuálny obsah PHB v sušine. Najvyššia koncentrácia biomasy bola zmeraná pri teplote 55 °C, kde koncentrácie dosiahla hodnotu $1,34 \pm 0,22$ g/l a koncentrácia PHB bola stanovená na hodnotu $0,42 \pm 0,05$ g/l (Tabuľka 10). V porovnaní s kultiváciou pri teplote 65 °C bola koncentrácie biomasy len o málo nižšia a to 1,24 g/l, pričom koncentrácia PHB bola výrazne nižšia a dosahovala hodnotu 0,11 g/l. Najväčší rozdiel medzi kultiváciou pri rôznych teplotách nastal pri hodnotách percentuálneho zastúpenia PHB v sušine. Obsah PHB v sušine pri teplote 55 °C činil 31,50 %, pričom pri teplote 65 °C to bolo len 8,87 %.

Z experimentu vyplýva, že ako kultivačná teplota a zároveň najvhodnejšia teplota pre produkciu biomasy a PHA je teplota 55 °C. Naopak pri teplote 60 °C kultúra najmenej rástla aj napriek tomu, že pri 65 °C bola nameraná druhá najväčšia koncentrácia biomasy a PHB.

4.2.2 Stanovenie optimálneho zdroja uhlíku na nárast biomasy a podiel PHA

Podobným postupom boli opäť stanovené hodnoty koncentrácie biomasy, PHB a percentuálneho obsahu PHB v sušine pri pridaní glukózy, sacharózy a glycerolu v koncentrácii 20 g/l ako zdroj uhlíka do minerálnych médií v dvoch paralelných prevedeniach. Kultivácia opäť prebiehala po dobu 72 hodín na trepačkách pri optimálnej teplote 55 °C a 180 rpm.

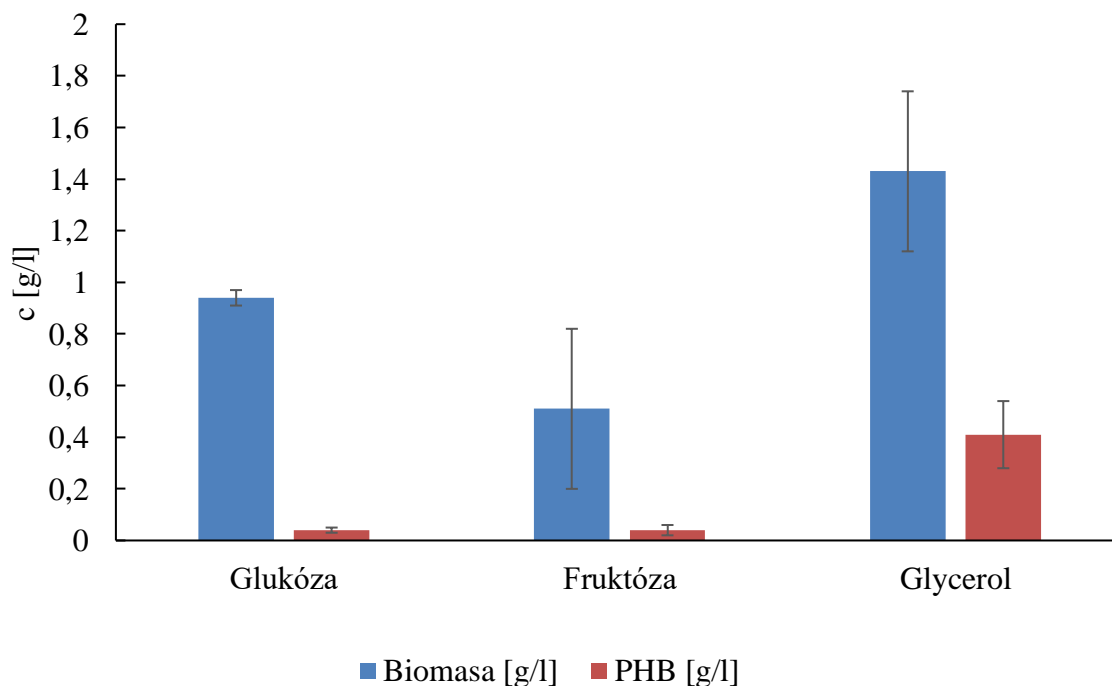
Tabuľka 11 Stanovenie optickej hustoty spektrofotometrickou metódou pri pridaní rozličných zdrojov uhlíka u baktérii *Tepidiphilus thermophilus*

Zdroj uhlíka	OD630 [-]
Glukóza	1,583 ± 0,400
Fruktóza	1,283 ± 0,087
Glycerol	2,400 ± 0,226

Po kultivácii nasledovalo spektrofotometrické stanovenie optickej hustoty vzoriek pri 630 nm. Najmenší zákal bol nameraný pri vzorke minerálneho média s obsahom fruktózy. O niečo väčšiu hodnotu vykazovala vzorka s pridaním glukózy. Najväčšia nameraná hodnota OD630 bola zaznamenaná pri vzorkách minerálneho média s pridaním glycerolu, a to $2,400 \pm 0,226$.

Tabuľka 12 Stanovenie koncentrácie biomasy, PHB a percentuálny obsah PHB v sušine pri pridaní rôznych zdrojov uhlíka u baktérii *Tepidiphilus thermophilus*

Zdroj uhlíka	Biomasa [g/l]	PHB [g/l]	Obsah PHB v sušine [%]
Glukóza	0,94 ± 0,03	0,04 ± 0,01	4,33
Fruktóza	0,51 ± 0,31	0,04 ± 0,02	8,33
Glycerol	1,43 ± 0,31	0,41 ± 0,13	28,13



Graf 2 Stanovenie koncentrácie biomasy a PHB pri pridaní rôznych zdrojov uhlíka u baktérii *Tepidiphilus thermophilus*

Následne po získaní biomasy a navážení potrebného množstva dvoch paralelných vzoriek meranie pokračovalo stanovovaním koncentrácie biomasy, PHB a obsahu PHB v sušine opäť pomocou GC-FID. Po spracovaní výsledkov najvyššie koncentrácie biomasy ($1,43 \pm 0,31$ g/l) a PHB ($0,41 \pm 0,13$ g/l) dosahovali vzorky, kde sa k minerálnemu médiu pridával ako zdroj uhlíka glycerol. Najväčšie množstvo PHB v biomase bol tento kmeň schopný najviac vytvoriť opäť pri raste na glycerolu, a to konkrétne 28,13 %. Veľmi podobné hodnoty koncentrácie a množstva PHB pri minerálnych médiách s obsahom glukózy a fruktózy nedosahovali ani polovicu z hodnôt ako pri kultúrach rastúcich na glycerolu.

4.2.3 Stanovenie vplyvu prekursorov na nárast biomasy, zloženia a podiel PHA

Posledným experimentom pre bakteriálny kmeň *Tepidiphilus thermophilus* bolo stanovenie vplyvu prekursorov na nárast biomasy, zloženia a podiel PHA. Do minerálnych médií so zaočkovaným bakteriálnym kmeňom *Tepidiphilus thermophilus* bol pridaný prekursor – kyselina levulová, kyselina valerová a 1,4-butandiol v koncentrácii 2 g/l hneď pri zaočkovaní minerálneho média. Prekursori slúžili na výstavbu PHA predovšetkým na tvorbu kopolymérov 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu. Vybrané boli na základe predchádzajúcich skúseností s inými mikroorganizmami. Pri experimente bola rovnako pripravená kontrola bez obsahu prekursorov. Ako zdroj uhlíka bol pre kmeň *Tepidiphilus thermophilus* pridaný glycerol, ako optimálny zdroj uhlíka. Následne boli paralelné vzorky v dvoch prevedeniach kultivované po dobu 72 hodín, pri teplote 55 °C na temperovaných trepačkách.

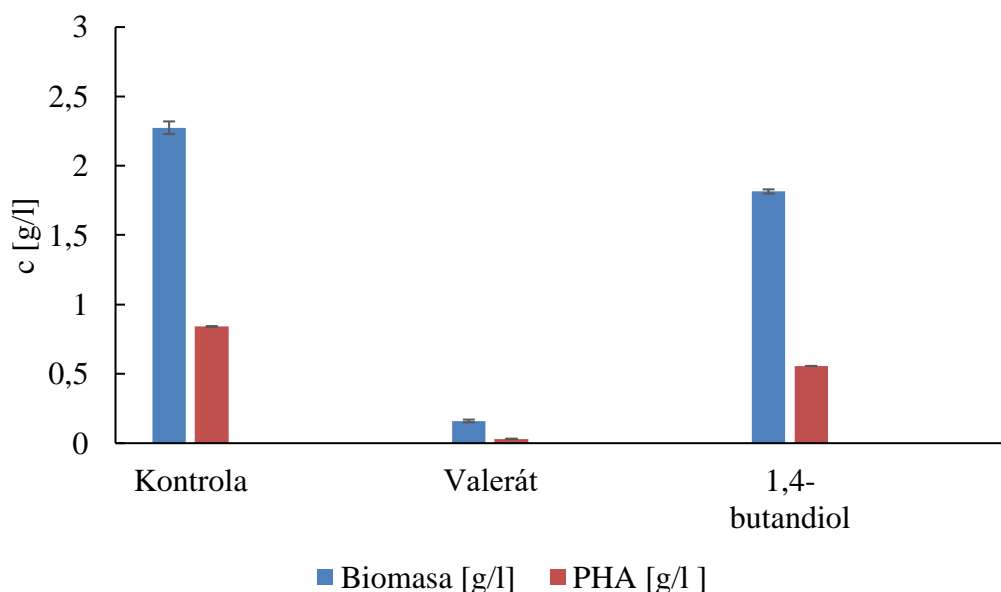
Tabuľka 13 Stanovenie optickej hustoty spektrofotometrickou metódou pri pridaní rôznych prekursorov u baktérii *Tepidiphilus thermophilus*

Prekursor	OD630 [-]
Kontrola	$4,293 \pm 0,083$
Levulinát	0
Valerát	$0,050 \pm 0,008$
1,4-butandiol	$3,297 \pm 0,212$

Po 72 hodinovej kultivácii boli vzorkám zmerané hodnoty optickej hustoty pri 630 nm spektrofotometrickou metódou. Najvyššia hodnota OD630 bola zmeraná vzorkám bez prekursoru – $0,429 \pm 0,008$ dá sa teda konštatovať, že prekursori pôsobili na kultúry inhibične. Kyselina levulová v minerálnom médiu pôsobila na kultúru inhibične a nepodarilo sa zmerať OD630. Vzorkám s 1,4-butandiolom bola hodnota OD630 stanovená na $0,330 \pm 0,021$.

Tabuľka 14 Stanovenie koncentrácie biomasy, PHB, PHBV a percentuálny obsah PHB a PHBV v sušine pri pridaní rôznych prekursorov u baktérii *Tepidiphilus thermophilus*

Vzorka	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	Obsah PHA v sušine [hm.%]	3HV [mol%]	4HB [mol%]
Kontrola	$2,275 \pm 0,045$	$0,841 \pm 0,003$	$36,98 \pm 0,88$	$3,05 \pm 0,59$	-
Valerát	$0,160 \pm 0,010$	$0,031 \pm 0,002$	$19,50 \pm 2,46$	$81,02 \pm 2,63$	-
1,4-butandiol	$1,815 \pm 0,075$	$0,557 \pm 0,001$	$30,68 \pm 0,23$	$2,59 \pm 0,11$	$6,14 \pm 0,04$



Graf 3 Stanovenie koncentrácie biomasy a PHA pri pridaní rôznych prekurzorov u baktérii *Tepidiphilus thermophilus*

Vzorky minerálnych médií s obsahom kyseliny levulovej nedosiahli potrebné množstvo biomasy (8–10 mg), aby vzorky mohli byť stanovované prostredníctvom GC-FID. Pri vzorkách s pridaním 1,4-butandiolu bola koncentrácia biomasy stanovená na hodnotu $1,815 \pm 0,075$ g/l a hodnota koncentrácie bola o tretinu nižšia než pri vzorkách bez prekurzoru. Pri vzorkách minerálneho média bez prekurzorov boli hodnoty koncentrácie biomasy ($2,275 \pm 0,045$ g/l) a PHA ($0,841 \pm 0,003$ g/l) najvyššie. To indikuje fakt, že v čase pridaní prekurzorov v lag fáze rastovej krivke, pôsobil prekurzor na kultúru ako inhibítor. Ak by došlo k pridaní prekurzoru po 24 hodinách kultivácie, by bol prekurzor u kultúry v exponenciálnej fáze pravdepodobne lepšie metabolizovaný. Najvyššie množstvo PHA v biomase bolo opäť stanovené vo vzorkách bez prekurzoru. Naopak najvyššie množstvo 3HV bolo stanovené na hodnotu až $81,02 \pm 2,63$ mol.% pri vzorkách s pridaním kyseliny valerovej. V tomto prípade bol prekurzor využitý pre biosyntézu kopolyméru najlepšie. Pri raste v médiu s obsahom 1,4-butandiolu bol v biomase detekovaný obsah 4-hydroxybutyrátu v kopolyméru s 3-hydroxybutyrátom, a to v množstve 6,14 mol.%, čo bola väčšia hodnota než množstvo 3-hydroxyvalerátu pri raste v prítomnosti kyseliny valerovej.

4.2.4 Optimálna teplota, zdroj uhlíka a stanovenie vplyvu prekurzoru na nárast biomasy, zloženie a podiel PHA

Pre kmeň *Tepidiphilus thermophilus* bola stanovená zoptimalizovaná kultivačná teplota na hodnotu 55 °C, pričom najlepší zdroj uhlíka pre tento kmeň je glycerol, ktorý najlepšie pôsobí na rast buniek a stavbu monomérených jednotiek PHA v bunkách. V prípade stanovenia vplyvu prekurzorov na nárast biomasy, zloženia a podiel PHA sa dokázalo, že v tomto prípade prekurzory pôsobili inhibične na kultúru. Aj pri malom množstve biomasy však bola pozorovaná schopnosť tvorby kopolyméru P(3HB-co-3HV) a P(3HB-co-4HB).

4.3 *Chelatococcus daeguensis*

Rovnako ako pri bakteriálnom kmeni *Tepidiphilus thermophilus*, aj pri kmeni *Chelatococcus daeguensis*, po genotypovom potvrdení schopnosti produkcie PHA tohto kmeňa, nasledovali experimenty, ktoré sa zameriavali na profiláciu podmienok, pri ktorých hlavným zámerom je nárast biomasy, podiel a zloženie PHA v sušine.

4.3.1 Stanovenie optimálnej teploty na nárast biomasy a podiel PHA

Pri stanovení optimálnej teploty sa ako kultivačné a minerálne médiá použili médiá zmieňované v kapitole 4.2. Kultivácia zaočkovaných minerálnych médií prebiehala pri teplotách 30 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C a 55 °C po dobu 72 hodín v dvoch paralelných prevedeniach. Po kultivácii bola zmeraná optická hustota na spektrofotometri pri 630 nm.

Tabuľka 15 Stanovenie optickej hustoty spektrofotometrickou metódou pri rôznych kultivačných teplotách u baktérii *Chelatococcus daeguensis*

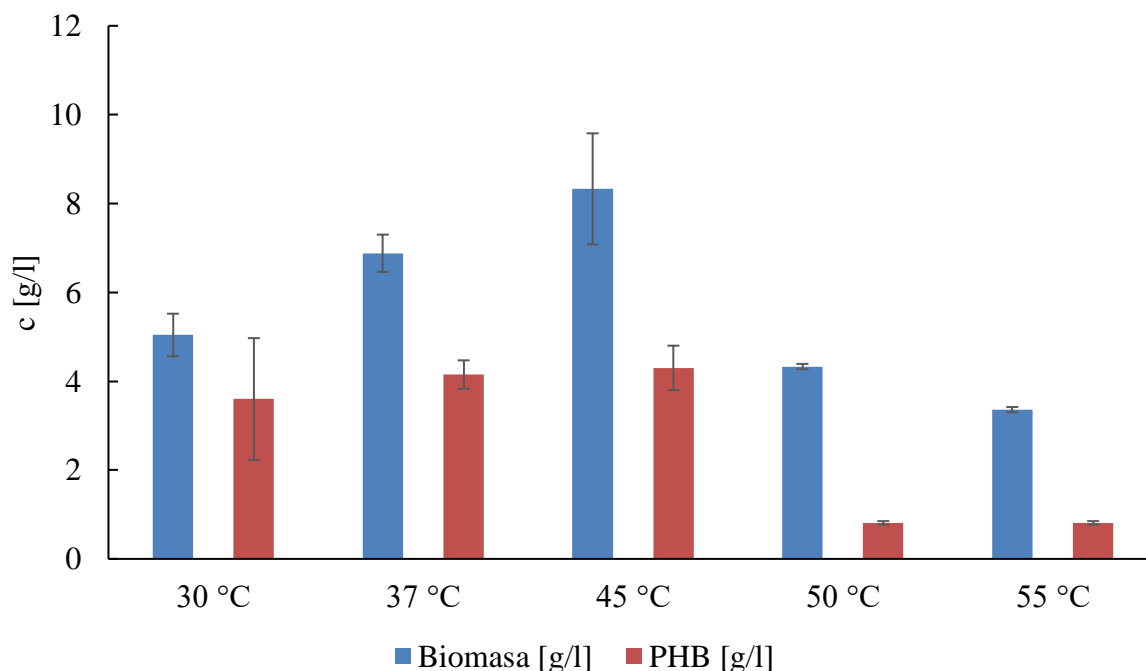
Teplota [°C]	OD630 [-]
30	3,863 ± 0,210
37	4,270 ± 0,253
45	6,590 ± 0,182
50	6,097 ± 0,052
55	4,083 ± 0,172

Po spracovaní merania OD630 bola najväčšia hodnota optickej hustoty pozorovaná pri teplote 45 °C a teda sa môže považovať za najoptimálnejšiu teplotu, pri ktorej je kmeň *Chelatococcus daeguensis* schopný vytvoriť čo najväčší obsah biomasy.

Po získaní dostatočného množstva biomasy bola stanovená koncentrácia biomasy, PHB a percentuálny obsah PHB v sušine prostredníctvom GC-FID, pričom na meranie boli použité dve paralelné vzorky.

Tabuľka 16 Stanovenie koncentrácie biomasy, PHB a percentuálny obsah PHB v sušine pri rôznych kultivačných teplotách u baktérii *Chelatococcus daeguensis*

Teplota [°C]	Biomasa [g/l]	PHB [g/l]	Obsah PHB v sušine [%]
30	5,04 ± 0,48	3,60 ± 1,37	69,40
37	6,88 ± 0,42	4,15 ± 0,32	51,81
45	8,33 ± 1,25	4,30 ± 0,50	60,33
50	4,33 ± 0,06	2,11 ± 0,03	48,70
55	3,36 ± 0,06	0,81 ± 0,04	24,32



Graf 4 Stanovenie koncentrácie biomasy a PHB pri rôznych kultivačných teplotách u baktérii *Chelatococcus daeguensis*

Najvyššie dosiahnuteľná hodnota koncentrácie biomasy bola pri vzorkách, ktoré boli kultivované pri teplote 45 °C. Rovnako aj koncentrácia PHB bola najvyššia pri teplote 45 °C. Najvyšší percentuálny obsah PHB v sušine bol pri teplote 30 °C. Ako je možné vidieť v grafe, pri teplotách vyšších, ako je optimálna teplota má kmeň *Chelatococcus daeguensis* nižšie koncentrácie biomasy a PHB než pri teplotách nižších ako optimum. Môžeme po tomto experimente konštatovať, že kmeň *Chelatococcus daeguensis* sa nachádza na hranici termofilie a termotolerancie.

4.3.2 Stanovenie optimálneho zdroja uhlíku na nárast biomasy a podiel PHA

Pri stanovení optimálneho zdroja uhlíku na čo najväčší nárast biomasy a podiel PHA, opäť pomocou GC-FID, sa použili 3 rôzne zdroje uhlíka – glukóza, fruktóza a glycerol v koncentrácii 20,0 g/l.

Tabuľka 17 Stanovenie optickej hustoty spektrofotometrickou metódou pri pridaní rozličných zdrojov uhlíka u baktérii *Chelatococcus daeguensis*

Zdroj uhlíka	OD630 [-]
Glukóza	4,427 ± 0,572
Fruktóza	4,083 ± 0,425
Glycerol	1,637 ± 0,204

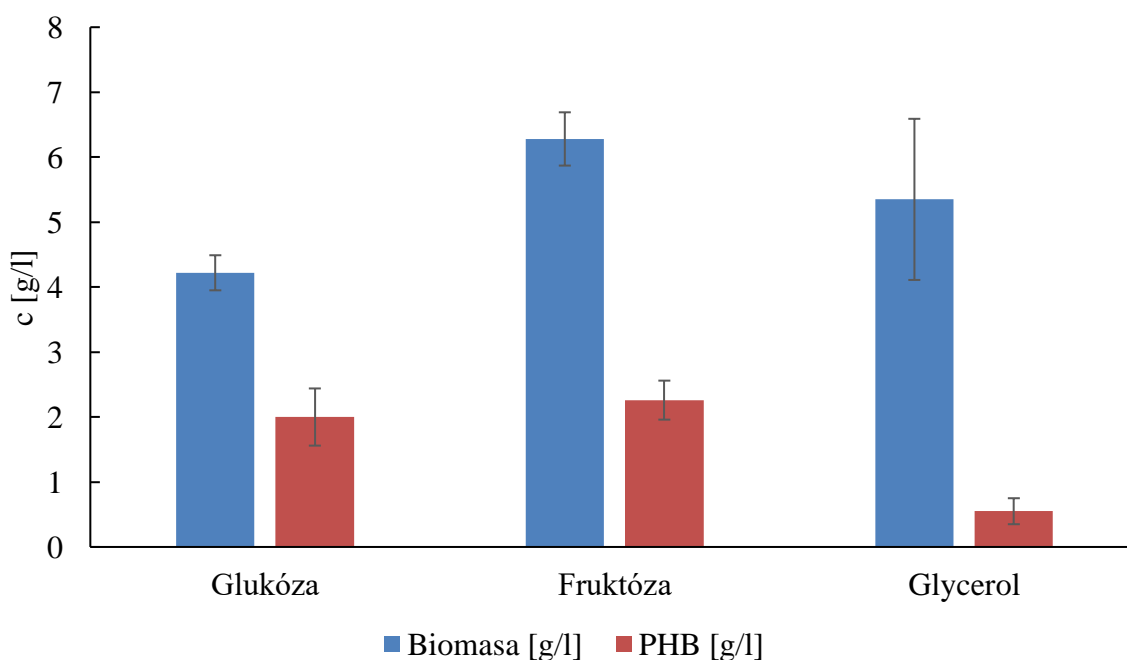
Po 72 hodinovej kultivácii bolo na spektrofotometri pri 630 nm zmeraná optická hustota. Najvyššie dosiahnutá hodnota OD630 bola nameraná pri vzorkách s prídavkom glukózy,

a to $0,433 \pm 0,057$. Najnižšia hodnota $0,164 \pm 0,020$ bola stanovená pri vzorkách s obsahom glycerolu.

Po stanovení optickej hustoty pri 630 nm nasledovalo stanovenie koncentrácie biomasy, PHB a percentuálneho obsahu PHB v sušine pomocou GC-FID troch vzoriek, s pridaním rôzneho zdroja uhlíka, v dvoch paralelných prevedeniach.

Tabuľka 18 Stanovenie koncentrácie biomasy, PHB a percentuálny obsah PHB v sušine pri pridaní rôznych zdrojov uhlíka u baktérii *Chelatococcus daeguensis*

Zdroj uhlíka	Biomasa [g/l]	PHB [g/l]	Obsah PHB v sušine [%]
Glukóza	$4,22 \pm 0,27$	$2,00 \pm 0,44$	46,97
Fruktóza	$6,28 \pm 0,41$	$2,26 \pm 0,30$	36,40
Glycerol	$5,35 \pm 1,24$	$0,55 \pm 0,20$	9,89



Graf 5 Stanovenie koncentrácie biomasy a PHB pri pridaní rôznych zdrojov uhlíka u baktérii *Chelatococcus daeguensis*

Najvyššie hodnoty koncentrácie biomasy boli stanovené u kultúr kultivovaných na fruktóze – $6,28 \pm 0,41$ g/l (biomasa) a $2,26 \pm 0,30$ g/l (PHB). Pričom najnižšia koncentrácia biomasy bola nameraná kultúram s obsahom glukózy. Naopak najvyšší percentuálny obsah PHB v sušine bol stanovený na 46,97 % v prítomnosti glukózy v minerálnom médiu. Najnižšia hodnota bola nameraná pri vzorkách, ktorých kultivácia prebiehala na glycerole. Napriek k tomu, že pri vzorkách minerálnych médií s glukózou boli koncentrácie biomasy a PHB najnižšie, no percentuálny obsah PHA v tejto biomasy bol najväčší, preto považujeme ako najlepší uhlikatý zdroj glukózu.

4.3.3 Stanovenie vplyvu prekursorov na nárast biomasy, zloženia a podiel PHA

Posledná profilácia podmienok pre bakteriálny kmeň *Chelatococcus daeguensis* bola stanovenie vplyvu prekursorov na nárast biomasy, zloženie a podiel PHA v biomase. Do minerálnych médií so zaočkoványm bakteriálnym kmeňom *Chelatococcus daeguensis* boli pridané 3 rôzne druhy prekursorov – kyselina levulová, kyselina valerová a 1,4-butandiol v koncentrácii 2g/l. Opäť ako v prvom prípade, prekursorsy boli vybraté na základe predchádzajúcich skúsenostiach s inými mikroorganizmami a pridané v čase zaočkovania médií. Jedna zo vzoriek slúžila ako kontrola, ktorá bola pripravená bez prekursorov. Všetky vzorky boli pripravené v dvoch paralelných prevedeniach s obsahom glukózy, ako najlepšieho zdroja uhlíka a vzorky boli kultivované na trepačkách po dobu 72 hodín pri teplote 45 °C.

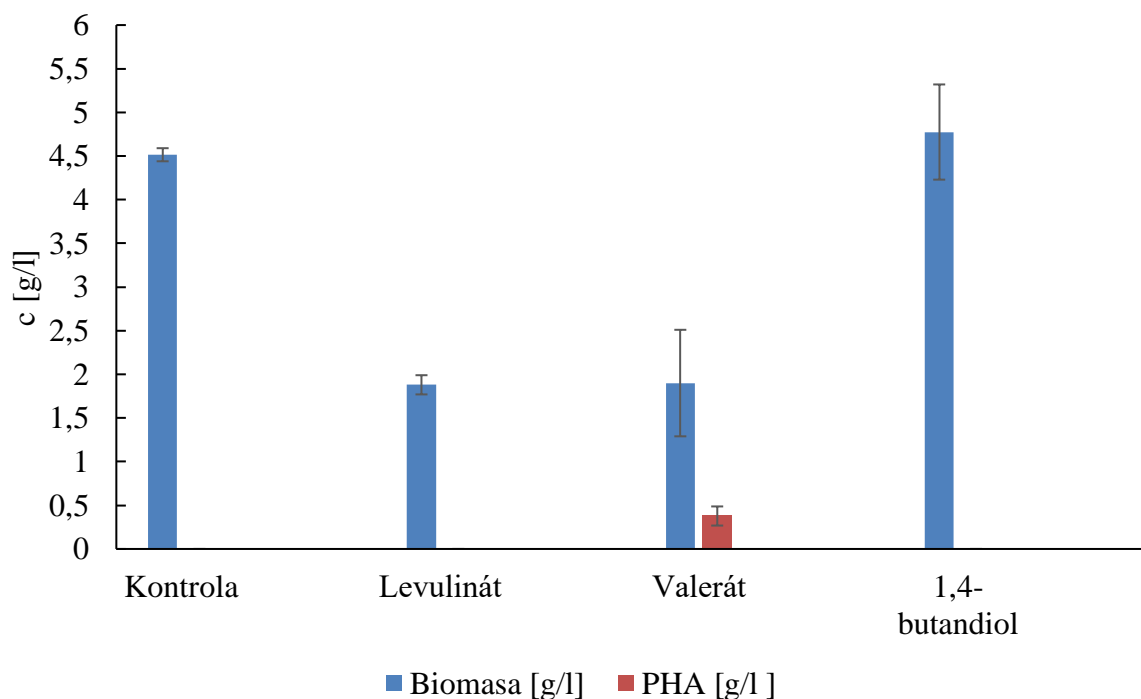
Tabuľka 19 Stanovenie optickej hustoty spektrofotometrickou metódou pri pridaní rôznych prekursorov u baktérii *Chelatococcus daeguensis*

Prekursor	OD630 [-]
Kontrola	7,443 ± 0,426
Levulinát	3,290 ± 0,608
Valerát	2,247 ± 0,420
1,4-butandiol	5,920 ± 0,930

Po kultivácii nasledovalo meranie optickej hustoty pri 630 nm spektrofotometrickou metódou. Najvyššia optická hustota OD630 bola nameraná u kultúry bez prítomnosti prekursoru. Druhá najvyššia hodnota bola pri vzorkách s obsahom 1,4-butandiolu na 0,592 ± 0,093. Najväčší inhibičný efekt vykazovala kyselina valerová, kedy hodnota OD630 bola oproti OD630 pri kontrole približne tretinová.

Tabuľka 20 Stanovenie koncentrácie biomasy, PHB a PHBV a percentuálny obsah PHB a PHBV v sušine pri pridaní rôznych prekursorov u baktérii *Chelatococcus daeguensis*

Vzorka	Biomasa [g/l]	PHA [g/l]	Obsah PHA v sušine [hm.%]	3HV [mol%]	4HB [mol%]
Kontrola	4,515 ± 0,075	2,027 ± 0,007	44,91 ± 0,59	-	-
Levulinát	1,880 ± 0,110	0,473 ± 0,015	25,20 ± 0,66	-	-
Valerát	1,900 ± 0,610	0,377 ± 0,109	20,087 ± 0,69	60,84 ± 0,67	-
1,4-butandiol	4,775 ± 0,545	1,962 ± 0,325	40,83 ± 2,14	-	1,25 ± 0,02



Graf 6 Stanovenie koncentrácie biomasy a PHA pri pridaní rôznych prekursorov u baktérii *Chelatococcus daeguensis*

Pri tomto experimente dosiahnuté hodnoty pri vzorkách s prekursorom 1,4-butandiolom a bez prekursoru vykazovali najvyššie hodnoty koncentrácie biomasy okolo 4 g/l. V tomto prípade 1,4-butandiol nepôsobil na kmeň *Chelatococcus daeguensis* inhibične, ale prekursor bol bunkami efektívne metabolizovaný. Vo vzorke minerálneho média s pridaním kyseliny valerovej ako v jedinej bol stanovený kopolymér P(3HB-co-3HV) v množstve 3HV $60,84 \pm 0,67$ mol.%. V prítomnosti 1,4-butandiolu boli bunky schopné tvoriť kopolymér P(3HB-co-4HB), a to s 1,25 mol.% 4-hydroxybutyrátu.

4.3.4 Optimálna teplota, zdroj uhlíka a stanovenie vplyvu prekursoru na nárast biomasy, zloženie a podiel PHA

Pre kmeň *Chelatococcus daeguensis* bola zoptimalizovaná kultivačná teplota stanovená na hodnotu 45 °C, pričom najlepší zdroj uhlíka pre tento kmeň je glukóza, ktorý najlepšie pôsobí na nárast buniek a stavbu monomérnych jednotiek PHA v bunkách. V prípade stanovenia vplyvu prekursorov na nárast biomasy, zloženia a podiel PHA sa dokázalo, že prekursori opäť pôsobili inhibične s výnimkou použitia 1,4-butandiolu, ktorý bol okrem iného metabolizovaný na 4-hydroxybutyrát.

4.4 Stanovenie využitia vybraných substrátov

Na záver experimentálnej časti bolo vykonané stanovenie využitia vybraných substrátov: fruktóza, glukóza, sacharóza, D-xylóza, laktóza, galaktóza, glycerol, slnečnicový olej, acetát sodný, propionát sodný, kyselina valerová, kyseliny levulová, ϵ -kaprolaktón, 1,4-butandiol, 1,6-hexandiol a γ -butyrolaktón. Na toto stanovenie bol použitý ELISA reader, kde sa meral

zákal vzoriek po 72 hodinovej kultivácii na titračnej mikrodosťke pri 630 nm v troch paralelných prevedeniach, a to pre oba testované bakteriálne kmene *Tepidiphilus thermophilus* a *Chelatococcus daeguensis*.

Tabuľka 21 Výsledky stanovenie využitia pri vybraných substrátoch pre bakteriálny kmeň *Tepidiphilus thermophilus*

Substrát	OD630 [-]
Kyselina valerová	1,430 ± 0,176
Propionát sodný	1,096 ± 0,250
Glycerol	0,917 ± 0,171
Acetát sodný	0,825 ± 0,081
Slniečnicový olej	0,662 ± 0,059
Galaktóza	0,413 ± 0,115
γ-butyrolaktón	0,367 ± 0,011
Kyselina levulová	0,337 ± 0,111
D-xylóza	0,310 ± 0,174
Laktóza	0,294 ± 0,082
Fruktóza	0,287 ± 0,281
1,6-hexandiol	0,218 ± 0,040
Sacharóza	0,141 ± 0,174
Glukóza	0,137 ± 0,259
1,4-butandiol	0,117 ± 0,063
ε-kaprolaktón	-

Po spracovaní výsledkov zo stanovenia využitia rôznych substrátov pomocou prístroja ELISA reader bola stanovená najvyššia hodnota OD630 pri vzorke s obsahom kyseliny valerovej – 1,430 ± 0,176. Naopak pri vzorke s ε-kaprolaktónom sa nepodarilo stanoviť OD630 pre príliš nízky zákal a teda tento substrát pôsobil na kultúru inhibične. Glycerol, ktorý bol stanovený ako za najlepší zdroj uhlíka, má až tretiu najvyššiu hodnotu. Ako je vidieť v tabuľke 20, kmeň *Tepidiphilus thermophilus* uprednostňuje kyseliny a glycerol pred sacharidmi. Nasledovali sacharidy, z ktorých najhoršie využila glukóza. Hodnoty kyselín (kyselina levulová a valerová) vykazovali veľké odlišnosti v množstve zákalu.

Tabuľka 22 Výsledky stanovenie využitia pri vybraných substrátoch pre bakteriálny kmeň *Chelatococcus daeguensis*

Substrát	OD630 [-]
Glukóza	1,985 ± 0,132
Fruktóza	1,454 ± 0,081
Propionát sodný	1,453 ± 0,052
Galaktóza	1,190 ± 0,098
D-xylóza	1,179 ± 0,046
Sľnečnicový olej	0,972 ± 0,044
Acetát sodný	0,911 ± 0,031
Kyselina valerová	0,852 ± 0,036
Glycerol	0,749 ± 0,042
1,4-butandiol	0,602 ± 0,013
γ-butyrolaktón	0,569 ± 0,022
1,6-hexandiol	0,551 ± 0,040
Kyselina levulová	0,514 ± 0,031
Laktóza	0,444 ± 0,018
Sacharóza	0,413 ± 0,036
ε-kaprolaktón	0,233 ± 0,025

Po meraní na ELISA reader pri 630 nm a stanovení využitia rôznych substrátov bola stanovená najvyššia hodnota OD630 pri vzorke s obsahom glukózy – 1,985 ± 0,132. Tento substrát bol v predchádzajúcom stanovení označený ako optimálny uhlíkový zdroj a pri tomto meraní môže slúžiť ako kontrola. Naopak pri vzorke s ε-kaprolaktónom bola nameraná najnižšia hodnota OD630. V tomto meraní vyššie hodnoty nadobúdali sacharidy a vo vode dobre rozpustné substráty. V prípade sacharidov má abnormálne nízke hodnoty laktóza a sacharóza. Hodnoty intenzity zákalu sa pre substráty kyselín stanovili na nižšie hodnoty, než má substrát sľnečnicový olej, ktorý je hydrofóbny.

Tabuľka 23 Porovnanie utilizácií kmeňov *Tepidiphilus thermophilus* a *Chelatococcus daeguensis* pri vybraných substrátoch

Substrát	OD630		Substrát
	<i>Chelatococcus daeguensis</i>	<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	
Glukóza	1,985 ± 0,132	1,430 ± 0,176	Kyselina valerová
Fruktóza	1,454 ± 0,081	1,096 ± 0,250	Propionát sodný
Propionát sodný	1,453 ± 0,052	0,917 ± 0,171	Glycerol
Galaktóza	1,190 ± 0,098	0,825 ± 0,081	Acetát sodný
D-xylóza	1,179 ± 0,046	0,662 ± 0,059	Slnečnicový olej
Slnečnicový olej	0,972 ± 0,044	0,413 ± 0,115	Galaktóza
Acetát sodný	0,911 ± 0,031	0,367 ± 0,011	γ-butyrolaktón
Kyselina valerová	0,852 ± 0,036	0,337 ± 0,111	Kyselina levulová
Glycerol	0,749 ± 0,042	0,310 ± 0,174	D-xylóza
1,4-butandiol	0,602 ± 0,013	0,294 ± 0,082	Laktóza
γ-butyrolaktón	0,569 ± 0,022	0,287 ± 0,281	Fruktóza
1,6-hexandiol	0,551 ± 0,040	0,218 ± 0,040	1,6-hexandiol
Kyselina levulová	0,514 ± 0,031	0,141 ± 0,174	Sacharóza
Laktóza	0,444 ± 0,018	0,137 ± 0,259	Glukóza
Sacharóza	0,413 ± 0,036	0,117 ± 0,063	1,4-butandiol
ε-kaprolaktón	0,233 ± 0,025	-	ε-kaprolaktón

Pri porovnaní utilizácii rôznych substrátov pre kmene *Tepidiphilus thermophilus* a *Chelatococcus daeguensis* je vidieť mnoho rozdielov, no spoločným rysom je inhibičný efekt substrátu ε-kaprolaktón pre oba kmene. V prípade kmeňa *Tepidiphilus thermophilus* sacharidy nadobúdali menšie hodnoty ako v prípade druhého kmeňa. Dobré rozpustné soli kyselín v oboch prípadoch mali dobré účinky na rast oboch kmeňoch. Kultivačné médium s kyselinou valerovou a levulovou pri kmeni *Chelatococcus daeguensis* mali menšiu intenzitu zákalu ako pri kmeni *Tepidiphilus thermophilus*.

5 ZÁVER

- Cieľom bakalárskej práce bola optimalizácia podmienok termofilných baktérií kmeňov *Tepidiphilus thermophilus* a *Chelatococcus daeguensis*, pri ktorých mikroorganizmy sú schopné tvorby čo najväčšej biomasy a v nej najväčšiemu obsahu PHA. Najskôr bol genotypovo potvrdený potenciál produkcie PHA na základe detekcie génu *phaC* pomocou molekulárne biologickej metóde – PCR. Nasledovalo fenotypové potvrdenie produkcie a stanovenie optimálnej teploty, zdroja uhlíka a vplyv prekursorov na nárast biomasy, zloženia a podiel PHA.
- Výsledok detekcie produktu PCR na agarózovej gélovej elektroforéze potvrdzuje prítomnosť génu *phaC* u oboch vzorkách bakteriálnych kmeňov a teda aj potenciálnu schopnosť kmeňa *Tepidiphilus thermophilus* a *Chelatococcus daeguensis* produkovať PHA.
- Za účelom stanovenia optimálnej teploty ako kultivačnej teploty a zároveň najvhodnejšej teploty pre produkciu biomasy a PHA je pre kmeň *Tepidiphilus thermophilus* hodnota 55 °C a pre kmeň *Chelatococcus daeguensis* hodnoty 45 °C.
- Na základe stanovenia množstva biomasy a PHA za najlepší zdroj uhlíka pre kmeň *Tepidiphilus thermophilus* je glycerol, ktorý najlepšie pôsobí na rast buniek a PHA v bunkách. Pre kmeň *Chelatococcus daeguensis* je najlepším zdrojom uhlíka glukóza.
- Pri pozorovaní vplyvu prekursorov na nárast biomasy, zloženia a podiel PHA boli hodnoty koncentrácie biomasy a PHA pri kmeni *Tepidiphilus thermophilus* najvyššie pri vzorkách minerálneho média bez prekursorov, ktoré slúžili na kontrolu. Je možné predpokladať, že pridanie prekursoru v lag fáze rastovej krivky pôsobilo inhibične na nárast buniek. Ak by došlo k pridaniu prekursoru po 24 hodinách kultivácie, by bol prekursor u kultúry v exponenciálnej fáze pravdepodobne lepšie metabolizovaný. Najvyššie množstvo 3HV bolo stanovené pri vzorkách s pridaním kyseliny valerovej, kedy bol prekursor využitý pre biosyntézu kopolyméru najlepšie. Bunky kmeňa *Chelatococcus daeguensis* najlepšie metabolizovali prekursor 1,4-butandiol. Vo vzorke minerálneho média s pridaním kyseliny valerovej ako v jedinej bol stanovený kopolymér 3HV. Obidvaja producenti tvorili pri raste v prítomnosti 1,4-butandiolu kopolymér s P(3HB-co-4HB).
- Oba kmene termofilných baktérií boli schopné utilizovať väčšinu vybraných substrátov až na substrát ϵ -kaprolaktón, ktorý pri kmeni *Tepidiphilus thermophilus* pôsobil inhibične, rovnako aj pri druhom kmeni, kedy minerálne médium vykazovalo najnižší zákal. Dobre rozpustné soli kyselín v oboch prípadoch mali dobré účinky na rast pre oba kmene. Pre kmeň *Tepidiphilus thermophilus* najlepším substrátom na rast bakteriálneho kmeňa bola stanovená kyselina valerová. Glukóza pri kmeni *Chelatococcus daeguensis* opäť vykazovala najvyššie hodnoty OD630, rovnako ako pri stanovení optimálneho zdroja uhlíka na nárast biomasy a podiel PHA.
- Po všetkých experimentoch je viditeľné, že oba kmene sú vhodné na použitie k biotechnologickej produkcii PHA. Kmeň *Chelatococcus daeguensis* sa svojimi nárokmi na rast a produkciu PHA skôr približuje k vlastnostiam termotolerantným

baktériám, no jeho schopnosti rastu a produkcie sú možné aj pri vyšších teplotách, avšak znižuje sa kvantita biomasy a PHA. V porovnaní s druhým kmeňom disponuje s väčším rozsahom použitia substrátov a prekursorov a teda do biotechnologického priemyslu je možné jeho použitie v širokej škále. Výhodou kmeňa *Tepidiphilus thermophilus* je jeho vysoká optimálna teplota na rast a produkciu biomasy a PHA. Je viac senzitívny na podmienky, no pri dodržaní jeho optimálnych parametrov je schopný výborných výsledkov. Na druhú stranu, v porovnaní s druhým kmeňom pri experimentoch nastávali väčšie odchýlky.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] SCHIRALDI, Chiara a Mario DE ROSA. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends in Biotechnology* [online]. 2002, **20**(12), 515-521 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1016/S0167-7799(02)02073-5. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779902020735>
- [2] MESBAH, Noha M. a Juergen WIEGEL. Life at Extreme Limits. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2008, **1125**(1), 44-57 [cit. 2019-03-04]. DOI: 10.1196/annals.1419.028. ISSN 00778923. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1419.028>
- [3] ROTHSCILD, Lynn J. a Rocco L. MANCINELLI. Life in extreme environments. *Nature* [online]. 2001, **409**(6823), 1092-1101 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1038/35059215. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/35059215>
- [4] NIEHAUS, F., C. BERTOLDO, M. KÄHLER a G. ANTRANIKIAN. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1999, **51**(6), 711-729 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1007/s002530051456. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051456>
- [5] BROCK, T. D. Life at High Temperatures. *Science* [online]. 1985, **230**(4722), 132-138 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1126/science.230.4722.132. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.230.4722.132>
- [6] ADIGUZEL, Ahmet, Hakan OZKAN, Ozlem BARIS, Kadriye INAN, Medine GULLUCE a Fikrettin SAHIN. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2009, **79**(3), 321-328 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.09.026. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701209003121>
- [7] NOLL, K.M. Thermophilic Bacteria. *Brenner's Encyclopedia of Genetics* [online]. Elsevier, 2013, 2013, , 63-65 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374984-0.01535-7. ISBN 9780080961569. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123749840015357>
- [8] ÇULHA, Mustafa, Ahmet ADIGÜZEL, M. MÜGE YAZICI, Mehmet KAHRAMAN, Fikrettin SLAHIN a Medine GÜLLÜCE. *Characterization of Thermophilic Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Scattering* [online]. 2008, **62**(11), 1226-1232 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1366/000370208786401545. ISSN 0003-7028. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1366/000370208786401545>

- [9] SAIKI, Takashi, Ryohei KIMURA a Kei ARIMA. Isolation and Characterization of Extremely Thermophilic Bacteria from Hot Springs. *Agricultural and Biological Chemistry* [online]. 2014, **36**(13), 2357-2366 [cit. 2019-03-14]. DOI: 10.1080/00021369.1972.10860589. ISSN 0002-1369. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00021369.1972.10860589>
- [10] WIEGEL, Juergen, Lars G. LJUNGDAHL a Arnold L. DEMAINE. The Importance of Thermophilic Bacteria in Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2008, **3**(1), 39-108 [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.3109/07388558509150780. ISSN 0738-8551. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388558509150780>
- [11] ZEIKUS, J.G. Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1979, **1**(4), 243-252 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/0141-0229(79)90043-7. ISSN 01410229. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022979900437>
- [12] PODDAR, A., R. T. LEPCHA a S. K. DAS. Taxonomic study of the genus Tepidiphilus: transfer of Petrobacter succinatimandens to the genus Tepidiphilus as Tepidiphilus succinatimandens comb. nov., emended description of the genus Tepidiphilus and description of Tepidiphilus thermophilus sp. nov., isolated from a terrestrial hot spring. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2014, **64**(Pt 1), 228-235 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1099/ijs.0.056424-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.056424-0>
- [13] PODDAR, Abhijit, Rinchen T. LEPCHA, William B. WHITMAN a Subrata K. DAS. Draft Genome Sequence of Tepidiphilus thermophilus Strain JHK30 T (JCM 19170 T) Isolated from a Terrestrial Hot Spring in India. *Genome Announcements*[online]. 2016, **4**(4), e00832-16 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1128/genomeA.00832-16. ISSN 2169-8287. Dostupné z: <http://genomea.asm.org/lookup/doi/10.1128/genomeA.00832-16>
- [14] YOON, J.-H., S.-J. KANG, W.-T. IM, S.-T. LEE a T.-K. OH. Chelatococcus daeguensis sp. nov., isolated from wastewater of a textile dye works, and emended description of the genus Chelatococcus. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2008, **58**(9), 2224-2228 [cit. 2019-03-18]. DOI: 10.1099/ijs.0.65291-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.65291-0>
- [15] LIANG, Wei, Shaobin HUANG, Yunlong YANG a Ran JIANG. Experimental and modeling study on nitric oxide removal in a biotrickling filter using Chelatococcus daeguensis under thermophilic condition. *Bioresource Technology* [online]. **125**, 82-87 [cit. 2019-03-18]. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.08.111. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412013065>

- [16] DEMIRJIAN, David C, Francisco MORÍS-VARAS a Constance S CASSIDY. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2001, **5**(2), 144-151 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00183-6. ISSN 13675931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593100001836>
- [17] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. *Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications* [online]. **126**, 45-56 [cit. 2019-03-18]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
- [18] KOVALCIK, Adriana, Katharina MEIXNER, Matthias MIHALIC, et al. Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **102**, 497-504 [cit. 2019-03-18]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.054. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016322802>
- [19] MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. *Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?* [online]. 2016, **192**, 271-282 [cit. 2019-03-18]. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630043X>
- [20] KOLLER, Martin. Biodegradable and Biocompatible Polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious Microbial Macromolecules for Pharmaceutical and Therapeutic Applications. *Molecules* [online]. 2018, **23**(2), 362 [cit. 2019-03-18]. DOI: 10.3390/molecules23020362. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/2/362>
- [21] FERRE-GUELL, Anna a James WINTERBURN. Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates with Controlled Composition and Microstructure. *Biomacromolecules* [online]. 2018, **19**(3), 996-1005 [cit. 2019-03-18]. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01788. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.7b01788>
- [22] ZAPLETAL, M. a J. TREJBAL. Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy. *Chemické Listy* [online]. Czech Society of Chemical Engineering, 2016, **110**(12), 860-867 [cit. 2018-04-21]. ISSN 00092770. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/120/120>
- [23] STEINBÜCHEL, Alexander a Bernd FÜCHTENBUSCH. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology* [online]. 1998, **16**(10), 419-427 [cit. 2019-03-18]. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01194-9. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779998011949>

- [24] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*[online]. 2005, **40**(2), 607-619 [cit. 2019-03-18]. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.053. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959204000949>
- [25] BRAUNEGG, Gerhart, Gilles LEFEBVRE a Klaus F GENSER. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998, **65**(2-3), 127-161. Microbiology Monographs. DOI: 10.1016/S0168-1656(98)00126-6. ISBN 978-3-642-03286-8. ISSN 01681656. Dostupné z: [https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0168165698001266](https://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0168165698001266)
- [26] CHEN, Guo-Qiang, Ivan HAJNAL, Hong WU, Li LV a Jianwen YE. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* [online]. 2015, **33**(10), 565-574 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.07.007. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779915001596>
- [27] LANE, Courtney E. a Michael G. BENTON. Detection of the enzymatically-active polyhydroxyalkanoate synthase subunit gene, phaC, in cyanobacteria via colony PCR. *Molecular and Cellular Probes* [online]. 2015, **29**(6), 454-460 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.mcp.2015.07.001. ISSN 08908508. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890850815300190>
- [28] JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal of Bacteriology* [online]. 2009, **191**(10), 3195-3202 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1128/JB.01723-08. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01723-08>
- [29] REHM, Bernd H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal* [online]. 2003, **376**(1), 15-33 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1042/bj20031254. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <http://www.biochemj.org/cgi/doi/10.1042/bj20031254>
- [30] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: VUTIUM, 2010. ISBN 978-802-1440.
- [31] ŠMARDA, J a J DOŠKAŘ. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005, s. 188. ISBN 80-210-3841-1.
- [32] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2018, **50**(1), 94-100 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.11.016. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166917301519>

- [33] WIEGEL, Juergen, Lars G. LJUNGDAHL a Arnold L. DEMAINE. The Importance of Thermophilic Bacteria in Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2008, **3**(1), 39-108 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.3109/07388558509150780. ISSN 0738-8551. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388558509150780>

- [34] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Engineering microorganisms for improving polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2018, **53**(1), 20-25 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.10.008. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166917301933>

- [35] TAO, Wei, Li LV a Guo-Qiang CHEN. Engineering Halomonas species TD01 for enhanced polyhydroxyalkanoates synthesis via CRISPRi. *Microbial cell factories* [online]. 2017, **16**(1), 48 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1186/s12934-017-0655-3. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-017-0655-3>

- [36] TSUGE, Takeharu. Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis. *Polymer Journal* [online]. 2016, **48**(11), 1051-1057 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1038/pj.2016.78. ISSN 0032-3896. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/pj201678>

- [37] JIANG, Xiao-Ran, Zhi-Hao YAO a Guo-Qiang CHEN. Controlling cell volume for efficient PHB production by Halomonas. *Metabolic Engineering* [online]. 2017, **44**(1), 30-37 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1016/j.ymben.2017.09.004. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109671761730263X>

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

7.1 Použité skratky

ATP	adenosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA reader	Enzyme-linked immunosorbent assai reader
EDTA	etyléndiamíntetraacetát sodný
FID	plameňovo-ionizačný detektor
GC-FID	plynová chromatografia s plameňovo-ionizačným detektorom
ISTD	interný štandard
lcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlhým bočným reťazcom
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty so stredne dlhým bočným reťazcom
NB	Nutrien Broth médium
NGIB	next generation industrial biotechnology
NK	Negatívna kontrola
PCR	polymerázová reťazová reakcie
PHA	polyhydroxyalkanoát
PHB	polyhydroxybutyrát
PHBV	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
PHV	polyhydroxyvalerát
PK	Pozitívna kontrola
PP	polypropylén
qPCR	kvalitatívna polymerázová reťazová reakcia
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkym bočným reťazcom
TBE	Tris-borát-EDTA
TCA	Citrátový cyklus
TES	trace elements solution
3HV	3-hydroxyvalerát